

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**THÈSE PRÉSENTÉE À L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
À TROIS-RIVIÈRES**

Comme exigence partielle
au Doctorat en Biophysique

par

Joanna ZDROJEWSKA-BARWICZ

Mécanisme de l'effet de surfactants sur la toxicité sélective d'un antibiotique polyénique, l'amphotéricine B
--

Avril 1994

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

à toi,

RÉSUMÉ

Le but principal de toutes les recherches dans le domaine des agents antifongiques à large spectre d'activité est de trouver une formulation la moins toxique d'un de ces agents. Parmi ces derniers, l'amphotéricine B (AmB) est un agent privilégié. L'AmB tout en étant un médicament très efficace est aussi très toxique pour les patients, ce qui limite sérieusement son utilisation.

Il a été démontré que les liposomes, les émulsion lipidiques, les surfactants, peuvent influencer la sélectivité cellulaire de l'AmB et diminuer sa toxicité chez les mammifères. Le mécanisme de cet effet de nombreux additifs sur l'activité de l'antibiotique, n'est pas bien connu.

Dans ce contexte, notre travail avait pour objectif principal de préciser le mécanisme mis en jeu dans l'effet d'une série des surfactants sur la toxicité sélective de l'AmB. En utilisant les méthodes d'analyse comme : spectroscopie d'absorption UV-VIS et le dichroïsme circulaire, diffusion de la lumière, ultracentrifugation, chromatographie d'exclusion par la taille et diffusion quasi élastique de la lumière, nous avons mis en évidence, en particulier, que :

- l'addition des différents surfactants exerce des effets semblables sur les agrégats-micelles d'AmB;
- des micelles mixtes se forment par pénétration des molécules de surfactant dans les agrégats-micelles de l'antibiotique;
- en cas de concentration plus élevée de surfactant, la structure agrégée se détruit complètement et les monomères d'AmB apparaissent dans la solution;

- les surfactants influencent l'activité sélective de l'AmB envers les stérols exactement à la concentration des surfactants qui provoque la monomérisation de l'antibiotique;
- la sélectivité maximale de l'AmB se trouve aux concentrations des surfactants, qui correspondent à leurs concentrations micellaires critiques en présence de l'AmB;
- l'interaction de l'AmB avec les lipoprotéines plasmatiques est toxique;
- monolaurate de sucrose, surfactant exemplaire, exerce un rôle de protecteur sur l'AmB dans le milieu du sérum;
- la diminution de la toxicité aiguë de l'AmB chez les souris est le résultat de la monomérisation de l'AmB par les surfactants;
- le "pore" hydrophobe est un modèle de la structure des agrégats de l'AmB dans un milieu aqueux;
- le "pore" hydrophobe est à la base de l'hypothèse de la toxicité de l'AmB.

En conclusion, une corrélation entre l'effet des surfactants sur l'état d'agrégation de l'AmB et son activité *in vitro* et *in vivo* a été établie ainsi qu'une relation entre la diminution de la toxicité aiguë de l'AmB avec différents additifs et l'interaction AmB-lipoprotéines du sang a été démontrée. Le modèle proposé de structures agrégées de l'AmB peut être utilisé dans l'étude de la toxicité du médicament.

Les résultats de cette recherche nous permettent de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la toxicité sélective de l'AmB. Ceci devrait contribuer à mieux définir les propriétés des différentes préparations de l'AmB qui, à son tour, permettraient d'améliorer l'indice thérapeutique de cet antibiotique.

REMERCIEMENTS

Je tiens, en premier lieu, à exprimer ma plus profonde reconnaissance au Docteur Ilona Gruda qui a dirigé d'une manière particulièrement vigilante et compréhensive mon travail. Sa gentillesse, son attention et sa grande patience ne peuvent que servir d'exemple lorsque vient le temps d'aborder des travaux de recherche.

Pas très loin derrière (à peine un paragraphe plus bas) se trouve mon codirecteur, le Docteur Pierre Tancrède dont la constante disponibilité, les judicieux conseils aux moments opportuns m'ont beaucoup aidée.

Mes remerciements vont au Docteur Jacques Bolard qui m'a accueillie pour le stage dans son laboratoire où j'ai trouvé que de la sympathie et une atmosphère scientifiquement stimulante.

J'offre toute ma reconnaissance au Docteur Wieslaw Gruszecki qui m'a permis de mieux percevoir le cheminement scientifique lors de plusieurs discussions fort stimulantes et sans qui le modèle des structures agrégées de l'amphotéricine B ne pouvait pas naître.

Merci aussi au Docteur Camille Chapados; j'ai grandement apprécié les nombreuses occasions de discussion qu'il m'a données pendant ces deux dernières années.

Je voudrais de plus témoigner ma gratitude à Monsieur Denis Labrecque et au Docteur Julien Gruda, dont le talent littéraire m'a permis d'alléger certains passages tortueux dans le texte qui suit.

Mes remerciements vont à tous les étudiants, les professeurs, le personnel technique et administratif du Département pour leur gentillesse et leurs nombreux encouragements.

Finalement, je remercie avec une humilité profonde ma famille pour sa confiance, sa grande patience et son inestimable support moral.

TABLE DE MATIÈRES

	page
Résumé.....	i
Remerciements.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des figures et tableaux.....	viii
Liste des abréviations.....	xii
 1. INTRODUCTION.....	 1
 2. PROBLÉMATIQUE.....	 4
2.1. Caractéristique générale de l'amphotéricine B.....	4
2.1.1. Structure moléculaire.....	5
2.1.2. Propriétés physico-chimiques.....	7
2.2. Activité de l'amphotéricine B.....	11
2.2.1. Activité antifongique : hypothèses du mécanisme.....	12
2.2.1.1. Hypothèse des stérols.....	14
<i>L'amphotéricine B et les stérols en milieu aqueux.....</i>	<i>15</i>
<i>L'amphotéricine B et les stérols dans les membranes.....</i>	<i>18</i>
2.2.1.2. Hypothèse des phospholipides.....	26
2.2.1.3. Hypothèse de perméabilité de la membrane.....	28
2.2.2. Autres activités de l'amphotéricine B.....	29
2.3. Modulation de la toxicité et de la solubilité.....	30

2.3.1. Autres polyènes.....	31
2.3.2. Autres agents antifongiques.....	35
2.3.3. Système de transport de l'amphotéricine B.....	35
2.3.3.1. Amphotéricine B liposomale.....	36
2.3.3.2. Complexe amphotéricine B-lipide.....	43
2.3.3.3. Complexe amphotéricine B-sulfate de cholestérol.....	43
2.3.3.4. Amphotéricine B en émulsion.....	44
2.3.4. Modulation de la solubilité de l'amphotéricine B.....	45
2.3.4.1. Dérivés de l'amphotéricine B.....	45
2.3.4.2. Complexation de l'amphotéricine B.....	46
2.3.4.3. Surfactants et l'amphotéricine B.....	47
L'amphotéricine B et le déoxycholate de sodium.....	48
L'amphotéricine B et les esters de sucrose.....	50
3. OBJECTIFS DU TRAVAIL.....	55
4. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	57
4.1. Étude du comportement de l'amphotéricine B en présence des	
surfactants.....	57
4.1.1. Méthodologie.....	57
4.1.2. Choix des surfactants.....	59
4.1.3. Effet de surfactants sur l'état d'agrégation de l'amphotéricine B....	61
4.1.3.1. Concentration micellaire critique (CMC) des composés	
purs.....	61
<i>Méthode de diffusion de la lumière.....</i>	<i>61</i>
4.1.3.2. Effet du déoxycholate de sodium sur l'état d'agrégation de	

l'AmB.....	63
<i>Méthode de diffusion de la lumière.....</i>	63
<i>Spectroscopie d'absorption UV-VIS.....</i>	65
4.1.3.3. Effet du munolaurate de sucrose sur l'état d'agrégation de	
l'AmB.....	68
<i>Méthode de diffusion de la lumière.....</i>	68
<i>Spectroscopie d'absorption UV-VIS et DC.....</i>	72
<i>Rapport d'absorbances $A_{409} : A_{347} (R)$.....</i>	76
<i>Méthode d'ultracentrifugation.....</i>	80
<i>Méthode de chromatographie d'exclusion par la taille.....</i>	81
<i>Méthode de diffusion quasi élastique de la lumière.....</i>	83
4.1.4. Effet du surfactant sur l'interaction de l'amphotéricine B avec	
le cholestérol et l'ergostérol.....	85
4.1.5. Discussion.....	89
4.2. Effet de surfactants sur l'interaction de l'amphotéricine B avec des	
lipoprotéines ou avec le sérum	97
4.2.1. Méthodologie.....	97
4.2.2. Effet des lipoprotéines sur les différentes formulations de	
l'amphotéricine B.....	98
4.2.3. Effet du surfactant (LS) sur l'amphotéricine B dans le sérum total	
et dans le sérum sans lipoprotéines.....	104
4.2.4. Discussion.....	108
4.3. Effet de surfactants sur la toxicité de l'amphotéricine B chez les	
souris.....	109
4.3.1. Méthodologie.....	109
4.3.2. Toxicité des mélanges amphotéricine B-surfactant chez les souris	109

4.3.3. Discussion.....	119
4.4. Modèle de l'organisation spontanée de l'amphotéricine B en milieu aqueux.....	124
4.4.1. Naissance d'une hypothèse de pore hydrophobe.....	124
4.4.2. Modèle des structures agrégées de l'amphotéricine B en milieu aqueux.....	127
4.4.2.1. Premier agrégat.....	130
4.4.2.2. Deuxième agrégat.....	135
4.4.3. Discussion.....	138
5. CONCLUSIONS.....	146
6. BIBLIOGRAPHIE.....	150
7. ANNEXES.....	181
A. Matériel chimique.....	181
B. Méthodes physico-chimiques.....	184
(1) Spectroscopie d'absorption UV-VIS.....	184
(2) Spectroscopie d'absorption de dichroïsme circulaire (DC).....	189
(3) Diffusion de la lumière.....	190
(4) Chromatographie d'exclusion par la taille.....	192
(5) Ultracentrifugation.....	193
(6) Diffusion quasi élastique de la lumière.....	193
C. Méthode biologique.....	196

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1	Structure de l'amphotéricine B.....	5
Figure 2	Modèle tridimensionnel de la molécule d'AmB.....	6
Figure 3	Spectre d'absorption électronique de l'AmB (10^{-6} M) dans le propanol.....	8
Figure 4	Spectres d'absorption électronique de solutions aqueuses d'AmB.....	9
Figure 5	Spectres DC de solutions aqueuses d'AmB.....	10
Figure 6	Structure du cholestérol et de l'ergostérol. À droite, la structure tridimensionnelle de chaque molécule.....	16
Figure 7	Structure d'un demi pore hypothétique.....	21
Tableau 1	Valeur du rayon moléculaire de quelques molécules.....	22
Figure 8	Modèle tridimensionnel de la plus probable position d'insertion de l'ergostérol et du cholestérol.....	24
Tableau 2	Structures moléculaires de quelques dérivés d'AmB.....	33
Tableau 3	Distribution de l'AmB chez la souris après une injection d'AmB liposomale (ABLC) ou de Fungizone.....	42
Figure 9	Structure de la γ -cyclodextrine.....	47
Figure 10	Structure du déoxycholate de sodium.....	49
Figure 11	Structure d'un ester de sucrose.....	51
Figure 12	Effet du LS sur le rapport d'absorbances R de solutions d'AmB dans 6,5 % de propanol. La concentration d'AmB est de $6,5 \times 10^{-6}$ M. Sans stérol, en présence du cholestérol ou de l'ergostérol.....	53
Figure 13	Sélectivité d'interaction AmB-stérol (ΔR) en présence de quatre	

	esters de sucrose : palmitate, myristate, laurate, caprate.....	54
Figure 14	Structures moléculaires de Tween 80, de F6C2MALT-1 et de Hecameg.....	60
Figure 15	CMC du DOC dans une solution tampon (pH=7,4).....	61
Tableau 4	Concentrations micellaires critiques de l'AmB, du DOC et du LS.....	62
Figure 16	Effet du DOC sur la diffusion de la lumière des solutions aqueuses d'AmB à quatre concentrations différentes.....	64
Figure 17	Spectres d'absorption électronique de solutions d'AmB ($2,5 \times 10^{-5}$ M) en présence de différentes concentrations de DOC	66
Tableau 5	Valeurs d'absorbance pour les bandes de spectres présentés sur la Figure 17.....	67
Figure 18	Effet du LS sur la diffusion de la lumière pour quatre concentrations de l'AmB et différentes concentrations de LS.....	69
Tableau 6	Valeurs des CMC pour le DOC et le LS en présence d'AmB.....	70
Figure 19	Variation du signal de diffusion de la lumière d'une solution d'AmB $6,5 \times 10^{-6}$ M en fonction de la concentration de LS, de DOC et de Tween 80.....	71
Figure 20	Spectres UV-VIS et de DC de l'AmB $6,5 \times 10^{-6}$ M en présence de concentrations de LS de $5,0 \times 10^{-6}$ M à $2,0 \times 10^{-4}$ M.....	73
Figure 21	Spectres en UV-VIS et en DC de l'AmB $6,5 \times 10^{-6}$ M en présence de concentrations du LS de $2,0 \times 10^{-4}$ M à $4,0 \times 10^{-3}$ M.....	75
Figure 22	Effet du LS sur le signal de diffusion de la lumière, sur le rapport d'absorbances R et sur la valeur du doublet dichroïque d'une solution aqueuse d'AmB de $6,5 \times 10^{-6}$ M.....	77
Figure 23	Spectre en UV-VIS d'une solution aqueuse d'AmB $2,5 \times 10^{-5}$ M.....	78
Figure 24	Spectres en UV-VIS de l'AmB seule à la concentration de	

	4,0 × 10 ⁻⁷ M(en dessous de sa CMC) et en présence de trois concentrations de LS.....	79
Figure 25	Résultats de chromatographie d'exclusion par la taille pour le mélange de 6,5 × 10 ⁻⁶ M d'AmB et de 5,0 × 10 ⁻² M LS.....	82
Figure 26	Diamètre des formes présentes dans la solution d'AmB 6,5 × 10 ⁻⁶ M en fonction de la concentration croissante de LS.....	83
Figure 27	Effet du DOC sur le rapport d'absorbances R de solutions d'AmB dans 6,5 % de propanol. Sans stérol, en présence du cholestérol ou de l'ergostérol.....	86
Figure 28	Sélectivité d'interaction AmB-stérols en présence du DOC.....	87
Figure 29	Effet de γ-cyclodextrine sur le rapport d'absorbances R de solutions d'AmB dans le propanol 6,5 %. Sans stérol, en présence du cholestérol ou de l'ergostérol.....	88
Figure 30	Spectres d'absorption d'AmB 2,6 × 10 ⁻⁵ M dans une solution aqueuse de propanol 10 %. AmB seule, AmB en présence de cholestérol et AmBen solution aqueuse de dextrose 5 %	100
Tableau 7	Paramètres spectraux de l'AmB dans différents milieux.....	101
Figure 31	Spectres d'absorption UV-VIS de solutions d'AmB 2,6 × 10 ⁻⁵ M sous forme de Fungizone dans du sérum sans VLDL et sans LDL, sérum sans lipoprotéines, sérum total.....	102
Figure 32	Spectres d'absorption UV-VIS de solutions d'AmB 2,6 × 10 ⁻⁵ M sous forme de Fungizone dans la solution tampon phosphate (pH=7,4), en présence des HDL, des VLDL, et des LDL.....	103
Figure 33	Effet du LS sur l'AmB (4,5 × 10 ⁻⁵ M) dans différents milieux.....	105
Figure 34	Spectres de DC de l'AmB (4,5 × 10 ⁻⁵ M) dans : l'eau, SSL , ST, SSL avec une quantité équimolaire de cholestérol par rapport à l'AmB.....	107

Figure 35	Spectres d'absorption de l'AmB à $4,76 \times 10^{-4}$ M dans du dextrose 5 %: sous forme de Fungizone, en mélange avec le LS au rapport molaire LS : AmB de 2 et au rapport molaire LS : AmB de 50.....	112
Figure 36	Spectres d'absorption de l'AmB $4,76 \times 10^{-4}$ M dans du dextrose 5 % : sous forme de Fungizone, en mélange avec le DOC au rapport molaire DOC : AmB de 42.....	112
Figure 37	Toxicité aiguë chez les souris après administration de différentes doses d'AmB en forme de Fungizone, micelles mixtes AmB : LS au rapport molaire de 1 : 2 et d'AmB monomérisée par le LS avec un rapport molaire LS : AmB de 50.....	113
Figure 38	Variation du rapport entre le pourcentage de survivants après l'injection de la solution AmB-LS (rapport molaire AmB : LS de 1 : 50) et le pourcentage de survivants traités avec la solution de la Fungizone en fonction de la dose d'AmB.....	114
Figure 39	Toxicité de l'AmB chez les souris après administration d'une dose de 5,1 mg/kg sous forme de Fungizone et d'AmB monomérisée par le LS avec un rapport molaire LS : AmB de 50.....	115
Figure 40	Toxicité de l'AmB chez les souris après administration d'une dose de 4,4 mg/kg sous forme de Fungizone , d'AmB monomérisée par le LS avec un rapport molaire LS : AmB de 50 et d'AmB monomérisée par le DOC avec un rapport molaire DOC : AmB de 42.....	116
Figure 41	Coupe transversale d'un modèle du pore hydrophile de l'AmB et d'une structure probable d'un pore hydrophobe élaborée d'après la forme précédente.....	127
Figure 42	Spectres UV-VIS de la forme monomérique de l'AmB dans 40 %	

	de propanol et de la forme partiellement agrégée dans l'eau.	
	La concentration de l'antibiotique est de $6,5 \times 10^{-6} \text{ M}$. Les déplacements spectraux sont marqués.....	130
Figure 43	Schéma d'un fragment d'organisation moléculaire de l'AmB dans l'eau.....	132
Tableau 8	Résultats des calculs des paramètres d , r , r' pour l'agrégat d'AmB avec le maximum d'absorbance à 347 nm.....	133
Figure 44	Schéma du rapport entre les rayons de deux pores : hydrophile (r') et hydrophobe (r).....	134
Figure 45	Spectres UV-VIS de l'AmB ($6,5 \times 10^{-6} \text{ M}$) dans la solution de Fungizone, en présence de propanol 5 % et en présence de Hecameg.....	136
Tableau 9	Résultats des calculs des paramètres d , r , r' pour l'agrégat d'AmB avec le maximum d'absorbance à 328 nm.....	136
Figure 46	Structure moléculaire de l'AmB et schéma de deux positions des molécules en formation "tête-à-queue" donnant deux sortes des dimères.....	139
Figure 47	Schéma d'agrégation des oligomères de l'AmB dans l'eau.....	144

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AmB	amphotéricine B
ABCD	dispersion colloïdale de l'amphotéricine B avec le sulfate du cholestérol
ABLC	complexe amphotéricine B-lipide
γ -CDx	γ -cyclodextrine
CMC	concentration micellaire critique
DC	dichroïsme circulaire
DOC	déoxycholate de sodium
DMPC	dimyristoylphosphatidylcholine
DMPG	dimyristoylphosphatidylglycerol
DPPC	dipalmitoylphosphatidylcholine
DMSO	diméthyle sulfoxyde
EPC	egg phosphatidylcholine
HDL	lipoprotéines à haute densité
LDL	lipoprotéines à basse densité
LS	monolaurate de sucrose
LUV	larges vésicules unilamelaires
MLV	larges vésicule multilamelaires
MPS	Mononuclear Phagocyte System
NOE	Nuclear Overhauser Effect
SDS	lauryl sulfate de sodium
SUV	petites vésicules unilamelaires
RMN	résonance magnétique nucléaire
RPE	résonance paramagnétique électronique

SSL	sérum sans lipoprotéines
ST	sérum total
TTAB	tétradécyltriméthyle d'ammonium
UV-VIS	ultraviolet-visible
VLDL	lipoprotéines à très basse densité

1. INTRODUCTION

Les mycoses systémiques constituent le plus grand problème chez les individus immunodéficients et chez ceux qui suivent une thérapie immunosuppressive, par exemple les patients atteints du cancer, ceux qui ont subi une transplantation ou ceux atteints du sida. Les infections provoquées par les champignons pathogènes causent de 3 à 10 % des décès chez tous les patients qui souffrent du cancer, et jusqu'à 40 % chez les gens souffrant d'hématopathies malignes (Edwards *et al.* 1978; Bodey G.P. 1977). Ce pourcentage est aussi très élevé chez les sidéens.

Le traitement de la plupart des mycoses n'existait pas avant 1960. La découverte de l'amphotéricine B en 1956 a permis de la reconnaître comme agent antifongique et, depuis, elle est considérée comme le médicament de choix dans le cas de nombreuses mycoses systémiques, malgré le fait qu'elle soit toxique et difficile à administrer (Medoff *et al.* 1983). Les principaux effets toxiques de l'amphotéricine B sont ceux qui affectent, en permanence, les reins, le système cardiovasculaire, le système nerveux central et la moelle de l'os. Ceux-ci peuvent causer la mort (Medoff *et al.* 1983).

La forme commerciale de l'amphotéricine B, la Fungizone, fait d'un mélange d'antibiotique et de déoxycholate de sodium est aussi toxique. Le traitement avec ce médicament est pratiqué uniquement en clinique, car il nécessite une administration intraveineuse très lente et à plusieurs reprises, à cause de ses effets secondaires (nausées, fièvre, frissons) et de sa toxicité à long terme.

L'administration par voie orale est moins toxique, mais également beaucoup moins efficace.

Pendant plus de 30 ans, les études étaient axées surtout sur la diminution de la toxicité de l'antibiotique, sur son remplacement par un autre médicament et, parallèlement, sur la connaissance du mécanisme d'action de l'amphotéricine B.

La nouvelle famille d'agents antifongiques, les azoles, tend à remplacer l'amphotéricine B dans certains cas. L'activité des dérivés synthétiques de l'amphotéricine B est aussi étudiée. L'analyse finale de ces nouveaux agents antifongiques n'est pas toujours complète et satisfaisante et, jusqu'à présent, l'amphotéricine B reste le meilleur médicament dans le traitement des mycoses systémiques (Sarosi G.A. 1990).

Durant la dernière décennie, dans le but de réduire la toxicité et d'augmenter l'efficacité de l'amphotéricine B, de nombreuses recherches ont été menées pour mettre au point une méthode optimale de préparation du médicament : par exemple, encapsuler l'amphotéricine B dans les liposomes phospholipidiques, l'entourer par les molécules d'un surfactant, l'associer à un lipide pour créer un complexe ou l'insérer dans une émulsion. Les résultats des études préliminaires sont souvent très encourageants et quelques nouvelles formulations de l'amphotéricine B sont déjà testées en clinique, par exemple l'amphotéricine B liposomale ou en complexe spécifique avec un lipide et du cholestérol. Avec les nouvelles préparations, de nouveaux problèmes apparaissent, comme la stabilité du produit ou les effets secondaires additionnels qu'il provoque.

Dans cette perspective, une meilleure compréhension du mode d'action de l'amphotéricine B et des mécanismes mis en jeu dans ses effets toxiques est indispensable.

Il est maintenant reconnu que l'amphotéricine B réagit avec les stérols membranaires. Sa propriété antifongique résulte de son interaction avec l'ergostérol, le principal stérol des cellules de champignons. L'interaction entre l'amphotéricine B et le cholestérol est probablement responsable de sa toxicité pour les cellules des mammifères. Il semble logique que l'augmentation de la sélectivité envers ces deux stérols pourrait être une bonne voie pour diminuer la toxicité de l'antifongique et pour augmenter la dose médicamenteuse.

Les récents travaux ont montré que les esters aliphatiques du sucrose inhibent l'interaction amphotéricine B - cholestérol, et par conséquent la toxicité de l'antibiotique pour les cellules des mammifères (Gruda *et al.* 1988a et 1991). Les mêmes concentrations de ces surfactants n'inhibent pas l'activité antifongique de l'amphotéricine B (Brajtburg *et al.* 1989).

Les études préliminaires semblent indiquer que de nombreux additifs peuvent moduler la sélectivité de l'amphotéricine B, et on peut supposer que le mécanisme de cette modulation est identique ou semblable dans tous les cas étudiés. De plus, cette modification de la toxicité sélective de l'amphotéricine B semble être liée à l'état d'agrégation de l'antibiotique.

Quelles sont les exigences pour que ces additifs soient efficaces? Quels types d'interactions existent entre les additifs et le polyène et par quel mécanisme la modification de l'activité de l'amphotéricine B s'effectue-t-elle? Quels sont les facteurs qui influencent la toxicité du médicament?

C'est pour répondre à ces questions que nous avons fait l'analyse de l'effet des différents surfactants sur l'état d'agrégation de l'amphotéricine B et sur sa toxicité sélective.

2. PROBLÉMATIQUE

2.1. Caractéristique générale de l'amphotéricine B

La découverte de la nystatine en 1949 (Hazen *et al.* 1951), produit métabolique de l'actomycète, a permis de découvrir plus de 60 autres antibiotiques qui furent nommés polyènes (Drouhet E. 1970). De ce grand nombre d'antibiotiques, seule l'amphotéricine B (AmB) fut acceptée comme médicament dans le traitement des mycoses systémiques.

L'utilisation d'autres polyènes est limitée aux cas d'infections cutanées. L'amphotéricine B est recommandée dans tous les traitements de l'aspergillose, de la blastomycose, de la candidiase disséminée, de la coccidioidomycose, de la cryptococcose, de la trichosporonose, de l'histoplasmosse, de la mucormycose et de la sporotrichose systémique (Graybill *et al.* 1983). Dans le traitement de la candidiase systémique, les médecins considèrent cet agent antifongique comme le plus efficace médicament actuellement disponible.

Trois propriétés principales de l'amphotéricine B ont suscité l'intérêt d'un très grand nombre de chercheurs.

Ces trois traits caractéristiques de l'AmB sont :

- l'activité dans la destruction des cellules fongiques,
- la toxicité pour les cellules des mammifères,
- une très faible solubilité dans l'eau.

Le but de toutes les études a été de comprendre l'action de l'AmB et de rendre le médicament meilleur. Un meilleur médicament signifie qu'il est plus efficace, car il est plus actif, moins dangereux, car il est moins toxique et plus facile à administrer étant plus soluble dans l'eau. Le troisième facteur compte beaucoup surtout dans le cas d'une injection intraveineuse.

2.1.1 Structure moléculaire

L'amphotéricine B a été isolée et décrite pour la première fois en 1956 (Gold *et al.* 1956) comme produit métabolique des *Streptomyces nodosus* M4575. La formule chimique de l'AmB est $C_{47}H_{73}NO_{17}$ et sa masse moléculaire est 924,11. Sa structure chimique qui a été déterminée en 1970 (Mechlinski *et al.* 1970) est présentée sur la Figure 1.

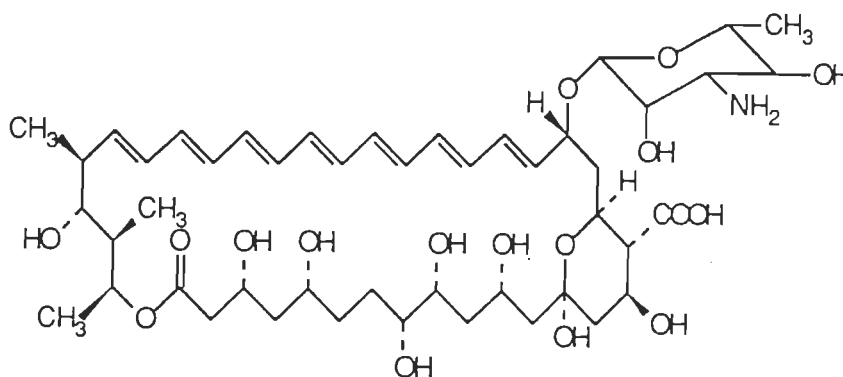


Figure 1. Structure de l'amphotéricine B

Une molécule d'AmB possède un cycle lactonique avec ses deux longs cotés, où un coté comporte sept liaisons doubles conjuguées, toutes en conformation *trans*, et l'autre coté parallèle contient des groupements hydroxyyles. Une

glucosamine liée au groupement hydroxyle du carbone 19 du cycle lactonique se trouve très proche du groupement carboxyle, lié également au lactone, ce qui permet, dans la solution aqueuse, la formation d'une liaison entre le groupement aminé et le carboxyle par l'intermédiaire d'une molécule d'eau (Berges *et al.* 1990). La forme géométrique de l'AmB est principalement gouvernée par deux angles déterminés par le degré de liberté de rotation des liens du carboxyle et du sucre aminé au lactone. On peut considérer la molécule comme ayant une conformation unique et énergétiquement stable dans les différentes conditions physico-chimiques (Sowinski *et al.* 1992). Le comportement conformationnel du cycle lactonique de l'AmB est indépendant du milieu qui l'entoure (Perun *et al.* 1969).

Les résultats d'analyse cristallographique par des rayons X (Ganis *et al.* 1971) et d'analyse de la minimisation d'énergie de la conformation (Berges *et al.* 1990) montrent que la structure d'une molécule d'AmB dans l'état isolé ou en présence de molécules d'eau est rigide, de forme allongée et presque cylindrique (Figure 2).

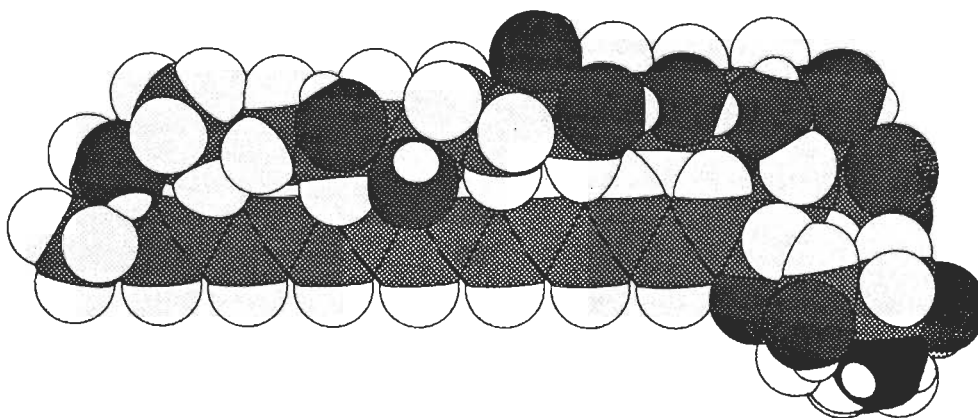


Figure 2. Modèle tridimensionnel de la molécule d'AmB

2.1.2 Propriétés physico-chimiques

Le caractère physico-chimique de l'amphotéricine B s'explique parfaitement par sa structure moléculaire. En voici une brève description.

La présence de deux groupes ionisables, le groupement carboxyle et le groupement aminé, permet de classer l'antibiotique dans le rang des amphotères. Cette propriété donne notamment son nom à l'amphotéricine B.

Les sept liaisons doubles conjuguées du cycle lactonique forment la partie hydrophobe de la molécule d'AmB, et l'autre côté comportant tous les groupements hydroxyles et la molécule de sucre liée au cycle, en forme la partie hydrophile. Ainsi, l'AmB peut être considérée comme amphiphile et, comme les autres amphiphiles dans l'eau, elle protège sa partie hydrophobe par la formation d'agrégats. Les forces intermoléculaires sont principalement des forces de Van der Waals où les interactions $\pi-\pi$ sont en cause.

La présence d'une série de liaisons doubles conjuguées, le trait d'appartenance de l'AmB aux polyènes, donne la possibilité d'examiner l'antibiotique par la méthode d'absorption en UV-VIS et par le dichroïsme circulaire (DC).

À l'état solide, l'amphotéricine B est une substance jaune. À cause de sa structure, elle est faiblement soluble dans l'eau, et comme les autres antibiotiques polyéniques se dissout mieux dans les solvants organiques polaires. Les résultats des études d'absorption électronique sont différents pour l'AmB dissoute dans ces deux types de solvant. Le spectre de la solution aqueuse de l'AmB à très faible concentration (10^{-8} M) ou à concentration plus élevée (par exemple 10^{-6} M) dans le propanol, montrent la structure vibrationnelle propre aux polyènes conjugués, présentant une série de bandes principales à 409 nm,

385 nm, 366 nm et 348 nm, ce qui correspond aux nombres d'onde de 24 450 cm^{-1} , 25 950 cm^{-1} , 27 350 cm^{-1} et 28 800 cm^{-1} (Figure 3).

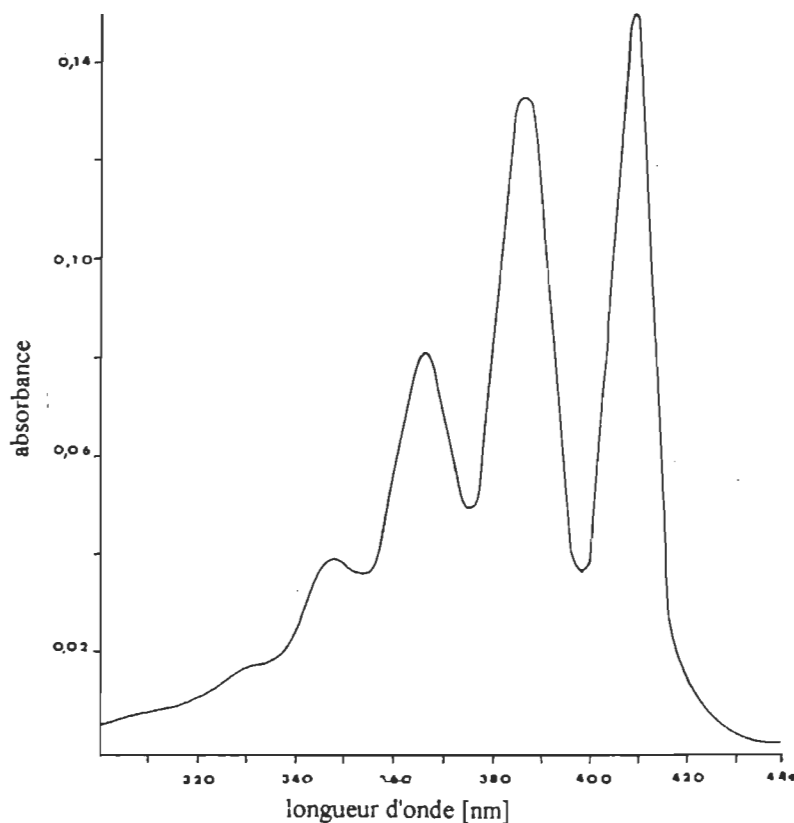


Figure 3. Spectre d'absorption électronique de l'AmB (10^{-6} M) dans le propanol

Avec l'augmentation de la concentration d'AmB (10^{-6} M) en milieu aqueux, la structure vibrationnelle diminue, l'absorbance de la bande à 347 nm augmente et une nouvelle bande apparaît à 328 nm (Figure 4-a). Aux concentrations plus élevées (par exemple $2,5 \times 10^{-5}$ M) on observe aussi un nouveau pic à 421 nm (Figure 4-b).

Ces nouvelles bandes représentent le découplage des niveaux d'énergie causé par l'interaction excitonique des molécules du polyène (Kasha M. 1963).

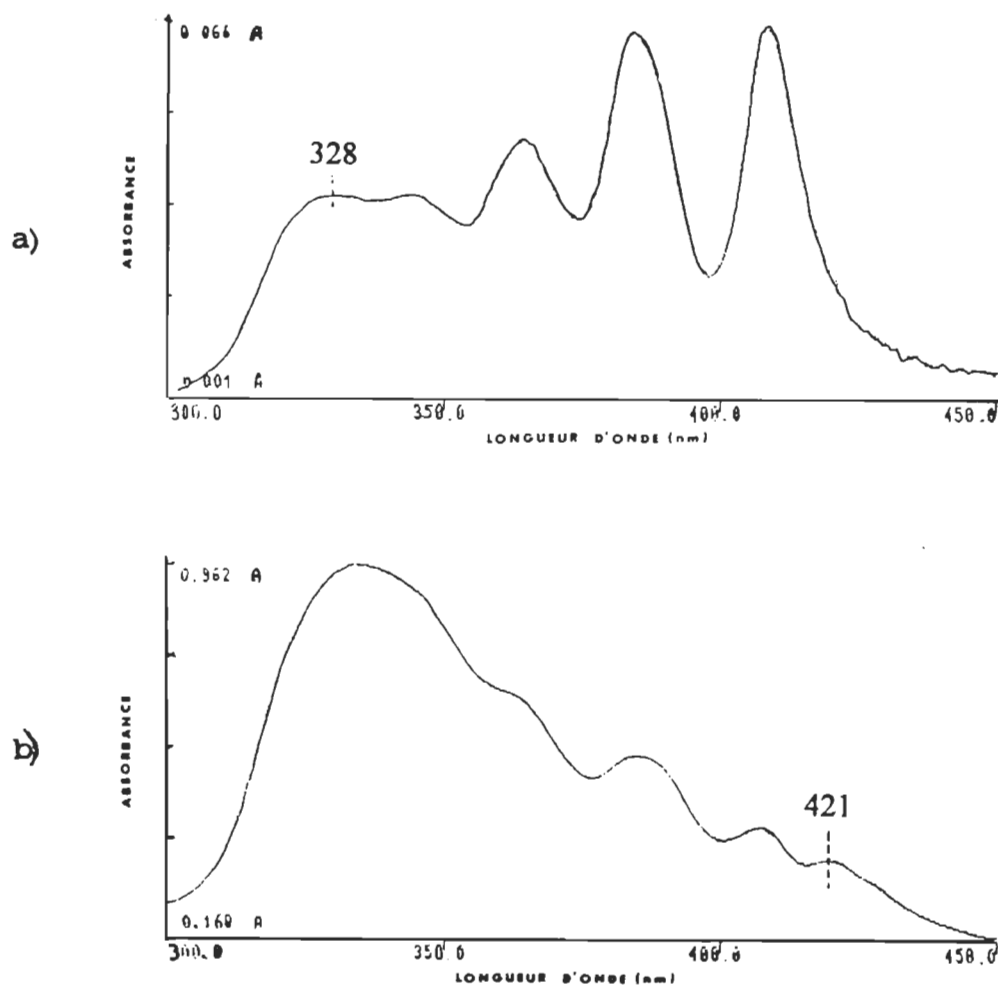


Figure 4. Spectres d'absorption électronique de solutions aqueuses d'AmB aux concentrations : a) $1,0 \times 10^{-6} \text{ M}$ et b) $2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$

Le spectre de DC enregistré dans des conditions similaires présente des pics aux longueurs d'onde avoisinant celles du spectre d'absorption UV-VIS. Pour une solution de concentration plus élevée que 10^{-6} M d'AmB, le spectre montre

une paire de bandes très intenses, l'une positive et l'autre négative, dans la région de 340 nm (Figure 5), confirmant que cette structure provient de l'interaction excitonique qui est à l'origine de la nouvelle forme d'AmB, l'agrégat (Bolard *et al.* 1980).

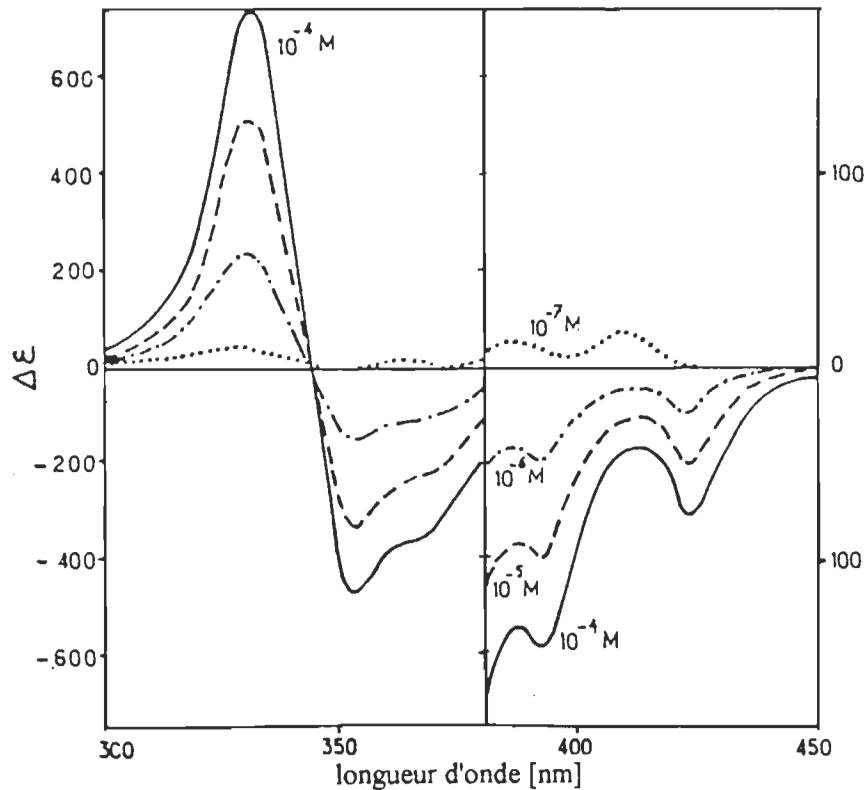


Figure 5. Spectres DC de solutions aqueuses d'AmB (d'après Bolard *et al.* 1980)

D'après les calculs effectués sur la base des spectres d'absorption électronique (Rinnert *et al.* 1977), Ernst et Hemenger (Ernst *et al.* 1981; Hemenger *et al.* 1983) ont formulé l'hypothèse que l'agrégat d'AmB possède la forme d'une hélice. L'unité qui se répète contient deux molécules d'antibiotique liées sur le même plan, avec leurs côtés conjugués situés parallèlement et vis-à-vis l'un de l'autre. Dans cet arrangement, les parties hydrophobes des molécules d'AmB sont protégées de l'environnement aqueux. La longueur de ce segment est

la même que celle d'une molécule d'AmB et égale à 24 Å. La distance entre les deux monomères du segment varie de 2,9 à 4,9 Å. Les auteurs ont attribué la bande à 328 nm du spectre d'absorption électronique ainsi que le très intense doublet du spectre de dichroïsme circulaire à l'association des dimères formant l'agrégat, et non à la formation des dimères qui ne possèdent pas d'activité optique. Il faut remarquer ici que les calculs effectués par Hemenger et ses collaborateurs concernent les résultats de spectres d'absorption UV-VIS et de DC de solutions aqueuses de la Fungizone, la formulation commerciale de l'AmB où l'antibiotique est en mélange avec le déoxycholate de sodium (DOC).

Du point de vue de la stabilité, l'AmB à l'état solide perd son activité lorsqu'elle est exposée à la lumière (Merck & Co. 1983). D'après l'analyse thermique, le médicament chauffé dans une atmosphère d'argon jusqu'à 137 °C (410 °K) conserve ses propriétés chimiques et ne perd pas son activité; dans ces conditions, sa structure moléculaire est préservée (Lubkowski *et al.* 1989). Par contre, dans l'atmosphère d'oxygène moléculaire, l'oxydation commence et se termine pratiquement à 150 °C (~420 °K). La désactivation des molécules d'AmB peut être aussi causée par le processus d'auto-oxydation dans lequel la présence des radicaux libres joue un rôle important (Schreier *et al.* 1985).

2.2 Activité de l'amphotéricine B

La plus importante propriété de l'amphotéricine B est son activité antifongique envers la large gamme des champignons pathogènes qui provoquent des mycoses systémiques mentionnées au début du chapitre 2.1. Il est essentiel de connaître le mécanisme de l'interaction du polyène avec les cellules des

champignons pathogènes car cela peut nous aider à comprendre le mécanisme de la toxicité de l'antibiotique.

2.2.1 Activité antifongique, hypothèses du mécanisme

Depuis 1959, de nombreux travaux ont été publiés traitant du mécanisme d'activité, de la toxicité et de la pharmacologie de l'AmB. Lampen et ses collaborateurs (Lampen *et al.* 1960) furent les premiers à montrer que les polyènes peuvent provoquer un changement de la perméabilité des membranes lipidiques des microorganismes jusqu'à la fuite du contenu de leurs cellules. Il est aussi bien connu que l'AmB n'a aucune activité sur les bactéries.

Sachant qu'un des résultats de l'intervention de l'AmB sur les cellules est la diminution de la quantité des ions K^+ à l'intérieur de la cellule, et que la membrane cellulaire fait partie intégrante de la cellule et est responsable du maintien de la perméabilité sélective, on a très tôt émis l'hypothèse que la membrane cellulaire est aussi le champ d'action de l'AmB.

Différentes méthodes physico-chimiques ont été utilisées pour étudier l'interaction entre l'AmB et des composants membranaires (Bolard J. 1986). Un bref résumé de quelques-unes de ces méthodes nous montre leurs possibilités et leurs points faibles. Les interactions entre l'AmB et des modèles membranaires peuvent être mesurées par différentes méthodes spectroscopiques, comprenant l'absorption électronique, la résonance Raman, le DC, la résonance paramagnétique électronique (RPE), et la résonance magnétique nucléaire (RMN). Les techniques de spectroscopie optique sont particulièrement bonnes pour ces études parce que la région d'absorption de l'AmB est différente de celle

des phospholipides ou des stérols et, de plus, le coefficient d'extinction est très grand, ce qui permet la détection de très faibles concentrations d'AmB.

Le spectre de résonance Raman pour l'AmB n'est pas sensible à l'environnement des molécules du polyène et n'ajoute pas plus d'information aux connaissances obtenues par l'absorption électronique (Medoff *et al.* 1983).

La méthode de dichroïsme circulaire est très sensible aux changements conformationnels de l'AmB et à l'influence de son entourage.

Les techniques de spectroscopie optique donnent l'information directe sur les molécules d'AmB. Les techniques magnétiques, quant à elles, peuvent éclaircir les effets de l'AmB sur la mobilité des stérols ou des phospholipides. Pour obtenir les résultats les plus clairs possible, il faut utiliser des concentrations d'AmB beaucoup plus élevées que celles utilisées dans les études biologiques. Malgré l'existence de ce dernier problème, ces techniques sont utiles. Par exemple, dans la méthode de RPE le signal du groupement nitroxyde est très sensible aux mouvements et, en localisant cette sonde à différents endroits de la chaîne d'acide gras d'une molécule de phospholipide ou en l'attachant à différentes positions d'une molécule de stérol, il est possible de montrer le déplacement de la molécule à l'intérieur de la membrane. Cependant, si on prend la décision de travailler avec des sondes, on ne peut pas négliger leur influence éventuelle sur la configuration de la molécule à laquelle elles sont liées, et par conséquent sur les propriétés de ce composé.

Les études faites à l'aide de la technique de ^3H RMN des modèles membranaires en présence d'AmB ont montré la disparition apparente de la bande du groupement choline des phospholipides, ce qui a conduit à l'interprétation qu'il existe une interaction entre les vésicules et l'AmB et que, à la concentration étudiée, l'antibiotique détruit les vésicules (Gent *et al.* 1976).

Dans les études sur des cellules, le problème le plus important est la très faible solubilité de l'antibiotique dans l'eau. De plus, il est très difficile de séparer l'AmB non-liée (qui reste en solution) des cellules. Pendant la centrifugation, les deux sédimentent. La technique de spectroscopie optique aide beaucoup dans les études de liaison AmB-cellule, mais seulement dans le cas où les longueurs d'onde d'absorption de l'AmB sont différentes de celles des composants de la cellule. Ce n'est pas le cas pour les érythrocytes en présence d'hémoglobine. Il existe un autre inconvénient dans l'utilisation des méthodes d'absorption électronique et de DC pour étudier les cellules : la dispersion de la lumière par ces cellules. Pour contourner ce problème, des vésicules ont été préparées à partir d'extraits de lipides d'érythrocytes humains, et étudiées par DC (Szponarski *et al.* 1987). Grâce à ce procédé, les auteurs ont obtenu des résultats indiquant que la complexation de l'AmB avec la membrane d'érythrocyte dépend de l'organisation moléculaire de cette membrane et de la présence de protéines membranaires.

Le fait que les membranes biologiques contiennent normalement des stérols et que les membranes des bactéries en sont dépourvus, est à la base d'une hypothèse sur le mécanisme de l'activité de l'antibiotique, appelée : hypothèse des stérols.

2.2.1.1 Hypothèse des stérols

Comme les cellules fongiques et les cellules des mammifères contiennent des stérols, il a été suggéré que l'interaction spécifique de l'AmB avec les champignons se fonde sur la différence de nature existant entre l'ergostérol, le

principal stérol fongique, et le cholestérol, le composant des cellules animales (Medoff *et al.* 1983). On a démontré que l'ergostérol placé à l'extérieur de la cellule inhibe davantage l'activité anticellulaire de l'AmB que le cholestérol (Kotler-Brajtburg *et al.* 1974), et que des concentrations, jusqu'à 10 fois plus faibles d'AmB sont suffisantes pour provoquer la fuite des ions K^+ de liposomes contenant l'ergostérol plutôt que de ceux contenant le cholestérol (Teerlink *et al.* 1980; Readio *et al.* 1982).

L'amphotéricine et les stérols en milieu aqueux.

Il a été prouvé que l'AmB se lie plus fortement avec l'ergostérol qu'avec le cholestérol (Norman *et al.* 1972; De Kruijff *et al.* 1974b; Readio *et al.* 1982). Pour la première fois, l'affinité sélective de l'amphotéricine B pour l'ergostérol par rapport au cholestérol a été observée pour des mélanges AmB-stérol dans une solution propanol-eau. Les spectres d'absorption dans l'UV-VIS de solution aqueuse du mélange d'AmB et de stérol révèlent que l'intensité des bandes à 409 nm et à 328 nm diminue et que celle de la bande à 347 nm augmente par rapport au spectre de l'AmB seule (Chen *et al.* 1977). Ces changements des spectres d'absorption ont permis d'établir une mesure de l'action de l'AmB sur les stérols, en considérant le rapport d'absorbance à 409 nm sur celle à 347 nm (Gruda *et al.* 1988a). Ce rapport permet de voir clairement la sélectivité de l'interaction de l'AmB avec les deux stérols.

La base moléculaire expliquant la plus grande affinité de l'AmB pour l'ergostérol plutôt que pour le cholestérol n'est pas encore claire.

Le cholestérol et l'ergostérol sont des molécules très semblables (Figure 6). La différence entre elles résulte du fait que l'ergostérol possède un groupement méthyle additionnel lié avec le C24 de la chaîne latérale et deux

liaisons doubles additionnelles, une sur le C7 de la partie alicyclique, et l'autre sur le C22 de la chaîne carbonée.

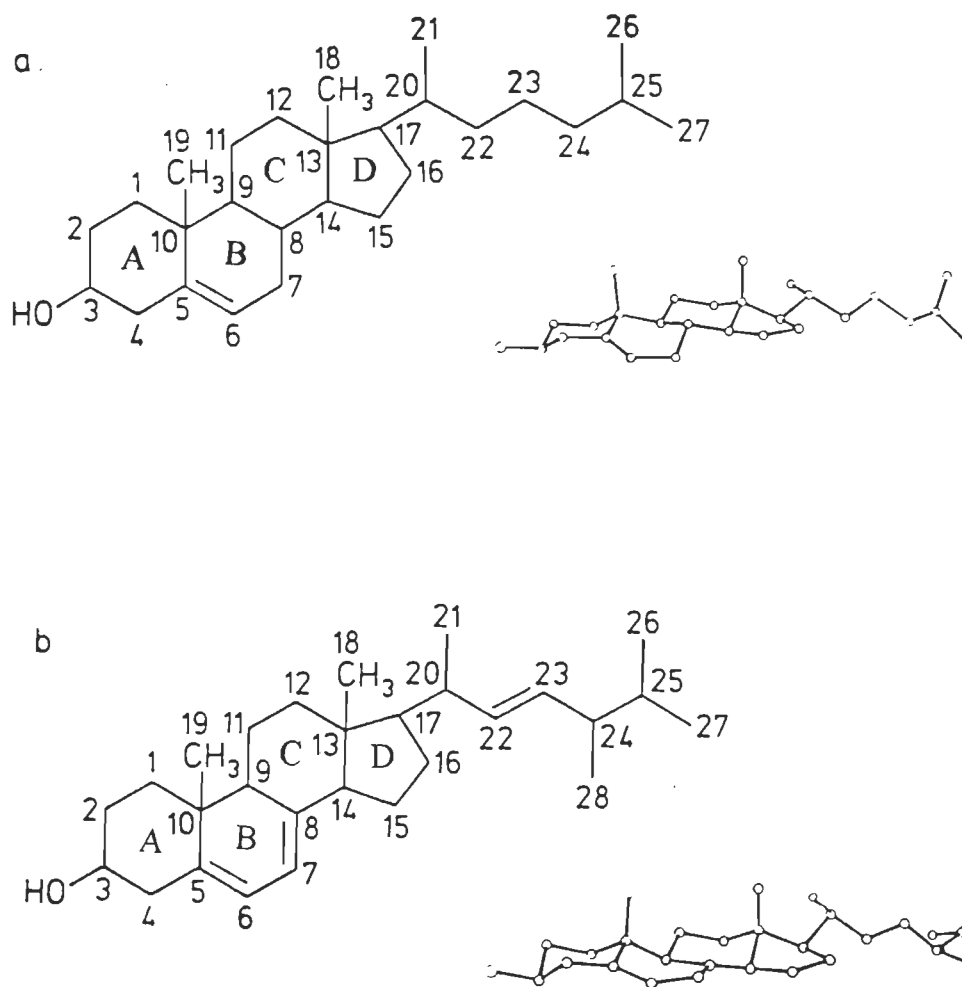


Figure 6. Structure du cholestérol (a) et de l'ergostérol (b). À droite, la structure tridimensionnelle de chaque molécule (d'après Marichal *et al.* 1990)

Certains auteurs (Clejan *et al.* 1985) considèrent que l'élément structural important de la molécule d'ergostérol, qui la rend plus apte que le cholestérol à se lier à l'AmB, est la présence d'un lien double entre les carbones 7 et 8.

Il a été aussi postulé que l'interaction AmB-stérol dépend de la structure de la chaîne latérale du stérol (Nakamura *et al.* 1980). D'après les dernières études, notamment par des calculs relevant de la mécanique moléculaire et de l'analyse comparative, on peut résumer les ressemblances et les différences entre les deux stérols (Baginski *at al.* 1989).

Les ressemblances :

- compte tenu des différentes conformations des cycles B, les squelettes des deux stérols sont similaires et relativement plats,
- la position du groupe hydroxyle par rapport à la partie alicyclique dans le cholestérol et dans l'ergostérol est identique,
- les squelettes de l'ergostérol et du cholestérol sont rigides et seulement une très petite déformation est possible,
- la chaîne latérale est flexible dans la partie contenant les atomes de carbone de C20 à C27 pour le cholestérol ou de C23 à C28 pour l'ergostérol.

Les différences :

- la conformation du cycle B de cholestérol est différente de la conformation du cycle B de l'ergostérol, ce dernier ayant une double liaison de plus, ce qui signifie que le cycle B dans l'ergostérol peut être déformé différemment;
- les stérols possèdent des chaînes latérales de géométrie différente, l'existence de la liaison double dans la chaîne de l'ergostérol le solidifie et limite le nombre de configurations (la liaison C22-C23 n'est pas rotative, les liaisons C20-C21 et C23-C24 n'ont qu'une double barrière de rotation).

Si on considère que les molécules des deux stérols ont une longueur quasi identique (18 Å) lorsque leurs chaînes sont étirées, que cette longueur se compare

à la longueur du chromophore heptaénique de l'amphotéricine B et que la chaîne du cholestérol a la possibilité de se plier et replier beaucoup plus facilement que celle de l'ergostérol, il devient plus évident que les chromophores heptaéniques, qui sont des chromophores rigides, forment des complexes similaires avec les deux stérols mais que la rigidité de la molécule d'ergostérol favorise un temps d'interaction plus long avec les chromophores heptaéniques que ne le fait le cholestérol avec sa chaîne mobile.

Tous les antibiotiques polyéniques complexent seulement les stérols qui possèdent le groupement hydroxyle en position 3β , le cycle planaire, et la chaîne aliphatique liée à C17 (Bittman *et al.* 1972; Borisowa *et al.* 1978; De Kruijff *et al.* 1974a et 1974b; Gruda *et al.* 1980; Norman *et al.* 1972; Van Hoogevest *et al.* 1978). L'interaction préférentielle des pentaènes avec le cholestérol et des heptaènes avec l'ergostérol suggère que la longueur du côté hydrophobe du polyène joue un rôle important (Nadeau *et al.* 1982).

Donc, on peut supposer que ce sont les forces hydrophobes, les forces non spécifiques de Van der Waals, et la liaison hydrogène entre l'hydroxyle du stérol et le carboxyle de l'antibiotique, qui jouent le rôle principal dans le mécanisme d'interaction polyène-stérol.

L'interaction de l'AmB avec des stérols isolés non inclus dans la membrane, a été étudiée dans le milieu aqueux. L'existence des complexes AmB-stérol dans l'eau suggère mais ne prouve pas leur existence dans les membranes cellulaires (Medoff *et al.* 1983).

L'amphotéricine et les stérols dans les membranes

Les observations d'Andreoli en 1974 (Andreoli T.E. 1974) et d'autres chercheurs (Cass *et al.* 1970; Holtz *et al.* 1970) ont indiqué que la présence de

l'AmB augmente radicalement la perméabilité des membranes contenant du stérol à l'eau, aux électrolytes et aux non électrolytes.

Pour analyser le mécanisme d'action de l'AmB au niveau membranaire, on a utilisé des membranes cellulaires artificielles et naturelles, des cellules de culture et des animaux.

De nombreuses études montrent que l'AmB influence le transfert des ions K^+ , Na^+ et H^+ à travers les vésicules phospholipidiques, qui peuvent donc être considérées comme de bons modèles pour l'étude des effets de l'AmB sur les cellules (Medoff *et al.* 1983).

À la base de leur morphologie, on peut diviser les vésicules phospholipidiques-modèles en :

- grandes vésicules multi-lamellaires (MLV) de grandeurs variées;
- grandes vésicules uni-lamellaires (LUV), plus homogènes, de grandeur supérieure à 0,1 μm de diamètre;
- petites vésicules uni-lamellaires (SUV) avec un diamètre de grandeur inférieure à 0,15 μm (Fielding R.M 1991; Janknegt *et al.* 1992).

Chaque type de liposomes mentionnés ci-dessus a été étudié dans la recherche du mécanisme d'action de l'AmB sur les membranes. Grâce à leur grand rayon de courbure, les LUV représentent le modèle le plus proche de la membrane cellulaire biologique. Malheureusement, leur stabilité n'est pas grande, donc on les remplace souvent par des SUV.

Comme il a été déjà mentionné, l'existence du complexe AmB-stérol en solution aqueuse, avec ou sans alcool, a été prouvée (Chen *et al.* 1977; Ernst *et*

al. 1979) et elle est à la base de la suggestion de l'existence d'un tel complexe aussi au niveau membranaire.

Souvent les études ont été faites sur des modèles membranaires contenant différentes quantités de stérol avec différentes concentrations d'AmB. Les mesures de la fuite des ions K^+ des MLV de lécithine sous l'effet de l'AmB ont donné un rapport stoechiométrique AmB : stérol dans le complexe de 1 : 0,7 (De Kruijff *et al.* 1974c). Les résultats des études en RPE, des SUV et des multicouches planes de lécithine montrent que la stoechiométrie du complexe AmB-stérol est de 1 : 1 (Ohki *et al.* 1979). Il faut bien noter que ce résultat ne correspond pas nécessairement à l'interaction entre l'AmB et le stérol au niveau de la membrane cellulaire. On a constaté que le stérol marqué peut se déplacer lentement de la région lipidique de la membrane des SUV vers les agrégats d'AmB en solution (Aracava *et al.* 1981b). Il existe aussi la possibilité que le complexe AmB-stérol puisse être expulsé de la membrane vers la phase aqueuse, par exemple, quand la température est au-dessus de la température de transition du phospholipide des SUV (Bolard *et al.* 1982).

D'après une analyse Scatchard effectuée sur les résultats d'absorption électronique montrant que l'AmB se lie aux SUV constitués de lécithine et du stérol, un seul complexe a été proposé avec un rapport molaire AmB-stérol de 1:1 (Radio *et al.* 1982). Probablement, la structure du complexe polyène-stérol dans les deux différents environnements, l'eau et la membrane moléculaire, est identique ou très semblable.

De quelle façon le complexe AmB-stérol affecte-t-il la membrane ?

Dès les premières recherches traitant du mécanisme du comportement de l'AmB dans la membrane, il a été suggéré que l'interaction antibiotique-stérol cause la formation de pores-canaux (Andreoli T.E 1974; Berges *et al.* 1990; Cohen B.E 1992; De Kruijff *et al.* 1974a). Chacun de ces pores est composé de deux demi-pores, ou comme disent les autres auteurs : chaque double pore est formé de deux pores (De Kruijff *et al.* 1974a). Un demi-pore contient huit molécules d'AmB et huit molécules de stérol, autrement dit, huit complexes polyène-stérol de rapport molaire 1 : 1 (Figure 7).

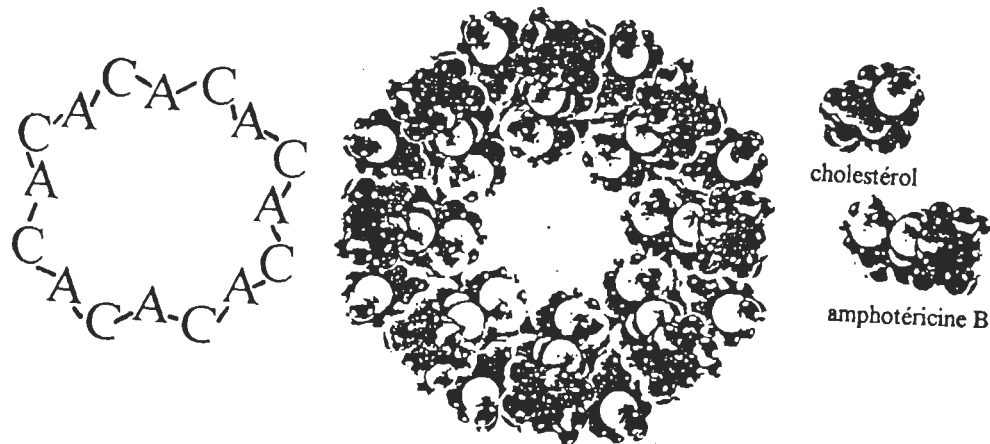


Figure 7. Structure d'un demi-pore hypothétique (d'après De Kruijff *et al.* 1974b).

A symbolise la molécule d'AmB, et C, la molécule de cholestérol.

Le demi-pore a la longueur identique à celle d'une molécule d'AmB, laquelle est comparable à la longueur d'une molécule de lécithine lorsqu'on la mesure du groupement phosphate au groupement méthyle terminal. Le canal à l'intérieur est formé par 10 groupements hydroxyles et un groupement méthylique provenant de chaque molécule d'AmB (Khutorsky V.E. 1992b). Ainsi, la forme cylindrique d'un demi-pore est hydrophile à l'intérieur, donc perméable à l'eau et aux petits

solutés, et hydrophobe à l'extérieur, donc liée aux chaînes lipidiques de la membrane. Les faits que les liaisons C-O de groupements hydroxyles soient pointées vers l'axe du canal, que les atomes d'hydrogène et d'oxygène de ces groupements se trouvent approximativement à la même distance de l'axe et que la valeur de la charge localisée sur un atome d'oxygène soit deux fois plus grande que celle d'un atome d'hydrogène, entraînent une affinité supérieure du canal pour les cations que pour les anions (Khutorsky V.E. 1992b). Le diamètre calculé du canal a une valeur de 6,5 à 8 Å, ce qui correspond très bien aux autres résultats expérimentaux (Capuozzo *et al.* 1985; De Kruijff *et al.* 1974a). Le Tableau 1 montre le rayon de quelques molécules choisies et explique pourquoi le canal membranaire de l'AmB n'est pas perméable au sucrose.

Tableau 1

Valeur du rayon moléculaire de quelques molécules (d'après Andreoli T.E 1974)

Molécule	Rayon [Å]
eau	1,50
urée	1,80
ion Cl ⁻	2,14
erythritol	3,50
sucrose	5,20

Quel est le mécanisme de formation des pores?

D'après le modèle de De Kruijff (De Kruijff B. 1990), ce sont des monomères de l'AmB qui réagissent avec la membrane lipidique et ensuite forment un canal. Tout d'abord, la partie hydrophobe de la molécule de l'antibiotique pénètre dans la couche membranaire, la partie hydrophile reste à l'extérieur de la membrane, et plus rien ne se passe si la membrane ne contient

pas de stérol. En présence du cholestérol, sa partie cyclique plane et rigide réagit de préférence avec la partie hydrophobe et rigide de la molécule d'AmB plutôt qu'avec les chaînes flexibles du phospholipide. Donc, c'est le rôle du stérol d'orienter la molécule d'AmB perpendiculairement à la surface membranaire et de former la structure cylindrique (le demi-pore) des complexes AmB-stérol. Cette orientation est énergétiquement défavorable si seulement une seule molécule d'antibiotique s'associe à la membrane. Il est évident que les deux groupements fonctionnels, aminé et carboxyle, se trouvent à l'interface membrane-eau et peuvent réagir par liaison hydrogène avec le groupement β -OH du stérol (Dufourc *et al.* 1984).

En parlant de la sélectivité de l'AmB pour l'ergostérol par rapport au cholestérol au niveau membranaire, il semble que, dans ce cas, les facteurs qui déterminent cette sélectivité soient les mêmes que ceux qui différencient les complexes AmB-cholestérol et AmB-ergostérol en milieu aqueux. En outre, les études des dernières années ont prouvé que, dans la bicouche lipidique, le mécanisme d'interaction amphotéricine B-cholestérol est différent de celui de l'interaction amphotéricine B-ergostérol (Bolard *et al.* 1991). Il existe une hypothèse que, contrairement à la formation des canaux par complexe polyène-ergostérol dans la bicouche lipidique munie de ce stérol, dans la membrane contenant du cholestérol, ce dernier n'intervient pas dans la formation des canaux. Par contre, une étude récente de la forme image-miroir du cholestérol suggère une interaction spécifique cholestérol-amphotéricine B (Mickus *et al.* 1992).

Il est très probable également que d'autres facteurs jouent un rôle important dans le mécanisme de l'activité sélective de l'AmB au niveau membranaire. La

méthode d'analyse conformationnelle qui a donné les résultats présentés à la Figure 8 comporte deux étapes:

- Première étape : le calcul de la conformation de la molécule isolée du stérol et son orientation sur la surface lipide-eau.
L'énergie conformationnelle totale est calculée comme la somme des contributions qui résultent des interactions Van der Waals, des potentiels de torsion, des interactions électrostatiques et du transfert d'énergie.
- Seconde étape : le calcul de conformation de la molécule insérée dans la couche lipidique.

Le résultat de ce calcul correspond à "l'empaquetage" le plus probable des molécules insérées et des molécules de lipide qui les entourent. Les deux champs, le champ occupé par chaque molécule et le champ intermoléculaire, ont été estimés après la projection sur le plan x-y et en conséquence, le champ principal moléculaire a été calculé à l'aide de l'analyse conformationnelle.

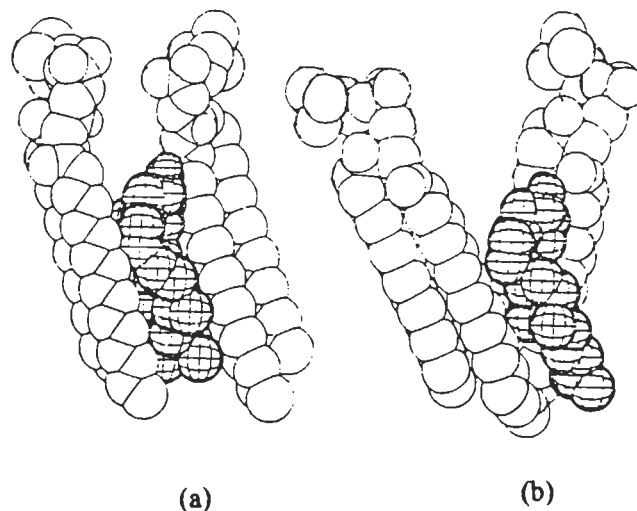


Figure 8. Modèle tridimensionnel de la plus probable position d'insertion de l'ergostérol (a) et du cholestérol (b) dans la bicouche de DPPC (d'après Marichal *et al.* 1990)

D'après l'analyse conformationnelle et d'après le plus probable "empaquetage" des molécules, il a été établi que le champ projeté sur la surface de la membrane de DPPC a une superficie de $0,35 \text{ nm}^2$ pour l'ergostérol, et de $0,34 \text{ nm}^2$ pour le cholestérol. De plus, la valeur de l'énergie d'interaction entre la molécule de stérol et les molécules de phospholipide qui l'entourent, est de $-66,9$ et $-58,9$ kJ/mole respectivement pour l'ergostérol et pour le cholestérol. En comparaison, la valeur d'énergie entre les molécules de phospholipide est égale à $-54,3$ kJ/mole. Ces données et le modèle présenté sur la Figure 8 suggèrent une interaction énergtiqument plus favorable et plus facile de l'AmB avec la membrane contenant de l'ergostérol qu'avec celle qui contient du cholestérol.

En résumé, dans le mécanisme de l'activité sélective de l'antibiotique au niveau membranaire l'orientation des molécules des stérols dans la bicouche membranaire joue probablement un rôle aussi important que la plus grande affinité de la molécule d'AmB pour la molécule d'ergostérol que pour celle de cholestérol.

Avec le modèle hypothétique d'activité de l'amphotéricine B, qu'on appelle "l'hypothèse des stérols", on ne trouve pas de réponse à la question : pourquoi, en présence de concentrations élevées d'AmB, observe-t-on une fuite du contenu d'une cellule dont la membrane est dépourvue de stérol ?

De plus, il est difficile de s'imaginer pourquoi la perméabilité de la bicouche membranaire peut être influencée par un seul demi-pore. Les hypothèses qui essayaient d'expliquer l'influence des demi-pores sur la perméabilité de la membrane par le rétrécissement de la bicouche ou par les sauts de demi-pores en haut et en bas de l'épaisseur de la membrane, ne sont pas convaincantes (Shervani *et al.* 1991). L'introduction de la notion du pore entier, composé de

deux demi-pores, permet de mieux expliquer la perméabilité de la membrane causée par l'AmB. Cependant, ni la structure d'un pore ni le mécanisme de sa formation n'ont encore été déterminés.

La présence du complexe AmB-stérol a été prouvée, mais de nombreuses études indiquent aussi l'existence d'autres facteurs qui influencent l'activité de l'AmB envers la membrane. Devant une telle situation, d'autres hypothèses ont été avancées.

2.2.1.2 Hypothèse des phospholipides

Il a été établi que la présence du stérol n'est pas nécessaire pour la formation d'un lien entre l'AmB et la membrane (Vertut-Croquin *et al.* 1983; Bonilla-Marin *et al.* 1991).

D'ailleurs, il semble peu probable que la formation des pores puisse être causée uniquement par un événement simple comme la complexation de l'AmB avec un stérol (Saint-Pierre Chazalet *et al.* 1988).

La formation des pores est influencée par l'interaction antibiotique-phospholipide et dépend du type de phospholipide. Dans les liposomes contenant l'ergostérol, l'AmB forme des pores (Cohen B.E. 1986) au diamètre différent de celui observé dans les vésicules préparées à partir de la membrane de *Leishmania* (Cohen *et al.* 1987).

Les expériences d'absorption électronique UV-VIS et de DC faites avec des SUV ou des MLV sans stérol et en présence d'AmB, ont montré que le rapport de l'AmB liée au phospholipide augmente lorsque la longueur de la chaîne d'acide gras du phospholipide saturé diminue et lorsque le nombre de doubles liaisons de cette chaîne augmente (Cohen B.E. 1992). Il est bien connu que la

longueur de la chaîne aliphatique du phospholipide détermine l'épaisseur de la bicouche, facteur qui joue un rôle dans la formation des canaux par l'AmB. Le rapport d'association de l'AmB avec le phospholipide est constant pour les vésicules en phase gel, tel que l'indique le spectre de DC (Bolard J. 1986).

Cette interaction entre le polyène et le phospholipide n'est pas étonnante, l'AmB comme amphiphile pouvant interagir avec n'importe quel autre amphiphile, y compris les phospholipides. Conformément à cela, il a été montré que les acides gras purs (Iannitelli *et al.* 1980) et les solutions concentrées de protéines réduisent l'effet anticellulaire de l'AmB (Brajtburg *et al.* 1982). Les spectres d'absorption UV-VIS d'AmB présentent les mêmes changements en présence de phospholipides qu'en présence de stérols (Chen *et al.* 1977).

On peut tenter d'expliquer le mécanisme d'augmentation de perméabilité des membranes sans stérol par la présence des pores bâtis seulement à partir des molécules d'AmB. Les études récentes sur les structures du complexe AmB-cholestérol suggèrent que le pore constitué seulement de molécules d'antibiotique présente les mêmes caractéristiques (Khutorsky V.E 1992a et 1992b). L'incorporation des molécules de stérol entre les molécules du polyène ne modifie pas le modèle de la structure de pore. Les états de très basse énergie du pore ne varient pas avec le changement de son diamètre de 6.5 Å à 8 Å, ce qui peut expliquer la présence ou l'absence de conductivité du pore et, par le fait même, la transition d'un état ouvert du pore à un état fermé (Hervé *et al.* 1989; Cohen B.E 1986; Ermishkin *et al.* 1977), ou pour reprendre les propos de Cohen, d'un pore aqueux à non-aqueux (Cohen B.E 1992). Cette transition se passe sans réarrangement total comme le changement du nombre des molécules dans un pore ou le changement de sa position relative. La diminution de conductivité

peut être le résultat du rétrécissement du pore ce qui, en conséquence, peut réduire aussi brusquement sa perméabilité.

Il faut ajouter que l'interaction hydrophobe du système de liaisons doubles de la molécule de polyène avec la partie cyclique, plane et rigide, de la molécule du stérol est plus favorable qu'avec la chaîne aliphatique flexible du phospholipide (Ahmed *et al.* 1990; De Kruijff *et al.* 1974c; Janoff *et al.* 1988; Kerridge D. 1979; Medoff *et al.* 1983; Norman *et al.* 1972).

Le mécanisme de formation des pores AmB-stérol est-il le seul pouvant expliquer l'action anticellulaire de l'AmB?

La réponse se trouve dans le chapitre suivant.

2.2.1.3 Hypothèse de perméabilité de la membrane

Cette hypothèse s'appuie sur le fait que la présence d'AmB influence la perméabilité des membranes qui ne contiennent pas de stérol. Par exemple, à température ambiante, l'AmB augmente la perméabilité aux ions K^+ et au glucose des membranes des SUV composées de DPPC sans stérol. Bien sûr, cela peut être causé, par exemple, par la formation de pores d'AmB seule. Dans les mêmes conditions, l'AmB n'a aucun effet sur les membranes des MLV.

Cependant, la perte des ions K^+ peut aussi s'expliquer non pas par la formation de pores, mais par la réduction de l'activité de l'ATPase membranaire suite à la diminution de l'interaction entre les phospholipides et les stérols induite par les polyènes (Thomas A.H. 1986; Fourcans *et al.* 1974; Sandermann H. 1978; Schaefer *et al.* 1975) ou par l'inhibition de la pompe Na^+/K^+ (Vertut-Doi *et al.* 1988) ce qui a été constaté sur les érythrocytes.

Dans une autre revue, on a suggéré que l'augmentation de la perméabilité aux protons résulte de perturbations locales des domaines de lipides membranaires causées par la présence de l'antibiotique polyénique (Kerridge *et al.* 1984).

Par contre, la sensibilité des membranes à l'antibiotique est toujours plus élevée en présence des stérols. Ainsi, les études sur les cellules de champignons montrent une corrélation directe entre la quantité de stérol et la sensibilité des cellules fongiques à l'AmB.

Les résultats d'une étude en DC de l'AmB en présence des LUV préparées de lipides d'érythrocytes humains, indiquent que la complexation de l'antibiotique avec la membrane d'érythrocyte dépend de l'organisation moléculaire de cette membrane et de la présence de protéines membranaires (Szponarski *et al.* 1987).

En résumé, tous les résultats des études suggèrent que la sensibilité naturelle des membranes aux antibiotiques polyéniques est davantage déterminée par l'organisation globale de la membrane, y compris la quantité de stérol, que par un seul composant de la membrane.

2.2.2 Autres activités de l'amphotéricine B

Outre son activité antifongique, l'AmB influence le système immunitaire (Vecchiarelli *et al.* 1987), par :

- la stimulation de certaines réponses immunitaires chez les souris, comme l'immunité humorale et l'immunité cellulaire (Blanke *et al.* 1977). On observe l'augmentation de la résistance contre les infections, par exemple dans le cas des candidiases l'AmB augmente l'activité antifongique des cellules de la rate et permet le développement d'une immunité spécifique

contre ce champignon (Brajtburg *et al.* 1986). Il faut ajouter que toutes les souches de souris ne répondent pas de la même façon à l'immunostimulation induite par l'AmB;

- la potentialisation de l'activité de certains agents anticancéreux (Coune A. 1988) qui fait, probablement, intervenir le système immunitaire; pour l'instant, l'existence de cet effet n'est pas prouvée chez l'homme.

2.3 Modulation de la toxicité et de la solubilité

Une autre propriété importante de l'amphotéricine B est sa toxicité relativement élevée pour les cellules de mammifères lorsqu'elle est administrée par injection intraveineuse.

D'après les études sur les cellules animales et sur les animaux, l'activité de l'AmB dépend de sa concentration. Cette activité se manifeste si la concentration d'AmB est supérieure à sa concentration micellaire critique (CMC) à partir de laquelle la forme agrégée de l'AmB apparaît. Il est possible que les structures de pores, dans lesquels on trouve un assemblage multimoléculaire hydrophobe de molécules de cholestérol ou d'ergostérol et d'antibiotique, sont formées plus facilement à partir des agrégats d'AmB. Malheureusement, la toxicité de l'antibiotique dépend aussi fortement de la dose administrée (Van Etten *et al.* 1991; Van't Wout *et al.* 1989). Cependant, la dose quotidienne maximale d'AmB, limitée à 1,0 mg/kg, peut être insuffisante pour un traitement clinique efficace.

Depuis plusieurs années, on espère diminuer la toxicité de l'AmB et augmenter sa solubilité. Cette dernière propriété est un facteur très important dans le mode d'administration de l'antifongique. Son amélioration peut influencer l'activité et la toxicité de l'AmB.

Du point de vue de la diminution de la toxicité de la thérapie antifongique, les solutions suivantes sont envisagées :

- remplacement de l'AmB par un autre polyène,
- remplacement de l'AmB par un autre agent antifongique,
- modulation du système de transport du médicament.

2.3.1 Les autres polyènes

Dans le but de trouver un nouveau médicament aussi efficace mais moins toxique que l'AmB, on a analysé d'une façon détaillée les autres polyènes. Les résultats des études démontrent que les antibiotiques polyéniques possédant un petit chromophore, tels que l'étruscomycine et la filipine, forment avec le cholestérol un complexe plus stable que celui formé avec l'ergostérol, alors que les antibiotiques possédant un chromophore heptaénique, tels que l'amphotéricine B et la nystatine, forment avec l'ergostérol un complexe plus stable que celui formé avec le cholestérol. En conséquence, les antibiotiques polyéniques avec un court chromophore sont plus toxiques pour les cellules animales que pour les cellules fongiques.

Différents dérivés de l'AmB qui par la parenté se classent aussi dans les polyènes, ont été synthétisés et vérifiés dans le but de remplacer l'AmB. La relation entre la structure et la toxicité de ces dérivés a été étudiée pour déterminer quelle partie de la molécule d'antibiotique est la plus importante pour causer le changement de la perméabilité de la membrane. Du point de vue de l'AmB, la non-saturation d'un segment de la molécule du polyène et la structure de cercle macrolide intacte semblent être essentielles pour l'activité biologique

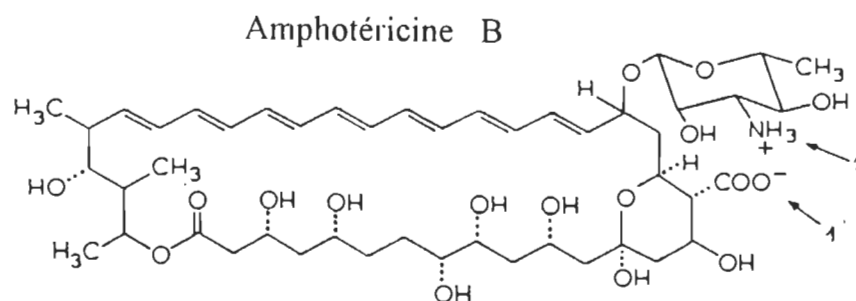
du médicament (Czerwinski *et al.* 1991; Shervani *et al.* 1991). Par exemple, l'hydrolyse du lactone (Cass *et al.* 1970) ou la saturation des doubles liaisons (Kinsky *et al.* 1967) abaissent énormément l'activité de cet antibiotique.

Par conséquent, au cours de la préparation des dérivés semi-synthétiques des substitutions s'effectuent à deux endroits de la molécule d'AmB : au niveau du groupement aminé et au niveau du groupement carboxyle (Szponarski *et al.* 1988). Le Tableau 2 montre les structures moléculaires de quelques dérivés d'AmB étudiés (Hervé *et al.* 1989).

En accord avec le modèle moléculaire d'interaction polyène-stérol, dans le dérivé où le groupement aminé est substitué, l'atome d'azote devrait être protonable pour assurer la formation de la liaison hydrogène avec l'atome d'oxygène de groupement hydroxyle du stérol. Les composés qui ne peuvent pas former cette liaison, comme N-acétyle amphotéricine B, présentent une très faible activité antifongique (Chéron *et al.* 1988). L'activité peut être restaurée avec l'incorporation d'un nouveau groupement basique, par exemple par l'aminocétylation (Czerwinski *et al.* 1991). Deux dérivés de l'AmB, le 3-diméthyle-aminopropyle-amide diaspartate de l'AmB et le N-(3-diméthyle-aminopropyle)maleimide de l'AmB démontrent une activité antifongique comparable à celle de l'AmB seule et une plus basse toxicité envers les globules rouges (Czerwinski *et al.* 1991).

Les polyènes qui possèdent un groupement carboxyle libre, zwitterioniques ou chargés négativement, influencent la perméabilité de la membrane probablement par le processus de la formation des pores mais leurs sélectivité envers les stérols est faible (Hervé *et al.* 1985).

Tableau 2

Structures moléculaires de quelques dérivés de l'AmB (d'après Hervé *at al.* 1989)

Name	Symbol	Substituent in site		Charge pH 7.5
		1	2	
Amphotericin B	AMB	COO ⁻	NH ₃ ⁺	+ -
<i>N</i> -Acetylamphotericin B	Ac-AMB	COO ⁻	NHCOCH ₃	-
Amphotericin B-methyl ester	AME	COOCH ₃	NH ₃ ⁺	+
<i>N</i> -Acetylamphotericin B methyl ester	Ac-AME	COOCH ₃	NHCOCH ₃	0
<i>N,N,N</i> -Trimethyl-amphotericin B methyl ester	DMS-AME	COOCH ₃	N ⁺ (CH ₃) ₃	+
<i>N</i> -(<i>N'</i> , <i>N'</i> -Dimethylglycyl)- amphotericin B methyl ester	diMeGlyAME	COOCH ₃	NHCOCH ₂ NH(CH ₃) ₂	+
<i>N</i> -Glycyllamphotericin B methyl ester	GlyAME	COOCH ₃	NHCOCH ₂ NH ₃ ⁺	+
Amphotericin B- <i>n</i> -propylamide	AMBPr	CONH(CH ₂) ₂ CH ₃	NH ₃ ⁺	+
Amphotericin B-3-(<i>N'</i> , <i>N'</i> - dimethylamino)propylamine	AMA	CONH(CH ₂) ₃ NH(CH ₃) ₂	NH ₃ ⁺	++

Les polyènes chargés positivement, avec groupement carboxyle estérifié ou amidé ou sans groupement carboxyle, ont un comportement différent envers les stérols. Ils font des canaux dans les membranes qui contiennent de l'ergostérol; mais dans les membranes contenant du cholestérol, ils en influencent la perméabilité lente et progressive aux concentrations élevées de polyène. Donc, pour ce groupe de dérivés, il existe une sélectivité (Chéron *et al.* 1988; Hervé *et al.* 1989). Les dérivés de l'AmB avec le groupement carboxyle bloqué par l'estérification, augmentent la perméabilité des membranes contenant de l'ergostérol ou autre stérol possédant une chaîne aliphatique identique à celle de l'ergostérol (Szponarski *et al.* 1988).

Les premières études sur les animaux ont démontré toutefois que ces derniers composés provoquent de graves problèmes neurologiques, par exemple des dommages au cerveau, donc leur toxicité *in vivo* est plus grande encore que celle de l'AmB non-modifiée (Gary-Bobo C.M. 1989; Hospental D.R. 1989). Une étude récente (Reuhl *et al.* 1993) dévoile la vérité. L'ester méthylique de l'AmB utilisé dans les premiers travaux n'était pur qu'à 60 % (Ellis *et al.* 1988; Hoeprich *et al.* 1985). En traitant les rats avec ce dérivé pur à 93 %, on obtient des résultats encourageants, c'est-à-dire l'ester méthylique de l'AmB est moins toxique que l'amphotéricine B seule. Néanmoins, la thérapie étendue avec ce dérivé peut conduire à une grande accumulation du polyène dans l'organisme et donc renforcer ses effets secondaires.

Il faut mentionner que souvent la comparaison des résultats d'études est très difficile. Par exemple, Reuhl et ses collaborateurs (Reuhl *et al.* 1993) ont réalisé des injections de la solution d'ester méthylique de l'AmB chez les souris, avec une vitesse de 1,5 µl/min. Dans la plupart des études cette vitesse est de 100 µl/min. Une telle différence peut influencer la toxicité du médicament.

Dernièrement, une nouvelle famille de dérivés de l'AmB a été examinée (Taylor *et al.* 1993). Il s'agit de modification du groupement hydroxyle du carbone 13 du cycle lactonique de la molécule d'antibiotique. Les résultats d'étude *in vitro* avec 13-O-méthyle et 13-O-hydroxyéthyle de l'AmB, indiquent une réduction de moitié de l'activité antifongique et une réduction de l'activité hémolytique envers les érythrocytes humains (Taylor *et al.* 1993).

2.3.2 Autres agents antifongiques

Tel que mentionné dans l'introduction, les nouveaux agents antifongiques concurrençant avec l'AmB sont des azoles (le kétoconazole, l'itraconazole, le fluconazole), des composés synthétiques qui à des concentrations très basses ($\sim 10^{-8}$ M), inhibent la biosynthèse d'ergostérol (Hospental D.R. 1989; Vanden Bosche H. 1985). Leur efficacité thérapeutique a été prouvée (Yoshida *et al.* 1986). Dans certains cas, surtout quand certains pathogènes fongiques sont résistants à l'AmB et plus sensibles aux azoles, ces derniers remplacent l'AmB (Marichal *et al.* 1990). Les essais *in vivo* où on a administré une combinaison d'AmB et d'un des miconazoles, econazoles ou clotrimazoles, donnent des résultats négatifs; on observe cependant un grand effet synergique. Ce mélange est plus toxique que chacun de ses composants pris séparément (Beggs *et al.* 1976; Odds F.C. 1982). Dans les études comparatives, l'AmB s'avère toujours la plus efficace (Sarosi G.A. 1990).

2.3.3 Système de transport de l'amphotéricine B

L'idée selon laquelle le transport du médicament directement vers les cellules

fongiques peut abaisser la toxicité de l'AmB a influencé les études sur les membranes. Une bonne modulation du transport de l'AmB signifie une protection des cellules mammifères contre l'action de l'AmB en conservant la forte activité de l'AmB envers les cellules des champignons (Graybill *et al.* 1982; New *et al.* 1981; Taylor *et al.* 1982).

Dans cette optique, quelques méthodes de préparation de l'AmB ont été mises au point, dont :

- incorporation de l'AmB dans les liposomes,
- complexation du polyène avec un lipide,
- dispersion colloïdale du complexe AmB-sulfate du cholestérol,
- dispersion de l'antibiotique en émulsion.

2.3.3.1 Amphotéricine B liposomale

L'interaction entre l'antibiotique polyénique et la membrane lipidique a été étudiée sur les cellules et sur les modèles membranaires. Les liposomes représentaient les principaux modèles de vésicules à bicouche testés dans la solution aqueuse. Ces liposomes ont une forme approximativement sphérique de 0,1 à 20 μm de diamètre, et ils sont composés d'une ou de plusieurs doubles couches concentriques avec la solution aqueuse au milieu (Ostro *et al.* 1989).

Il y a plus de 10 ans que Roger New et ses collègues ont incorporé l'AmB dans les liposomes (New *et al.* 1981) pour étudier l'effet de ce médicament sur les cellules des parasites *Leishmania*. Ils ont conclu que l'AmB dans les liposomes (l'AmB liposomale) est moins toxique que l'AmB seule et que son activité sur les cellules fongiques ne change pas. D'autres groupes de chercheurs ont commencé à suivre ce chemin (Juliano *et al.* 1985; Graybill *et al.* 1982).

En étudiant les propriétés de l'AmB liposomale, on a utilisé différents formats de vésicules-liposomes, différents rapports moléculaires AmB / lipide, un grand nombre de phospholipides, différents niveaux de saturation et de longueurs de la chaîne d'acide gras des phospholipides, etc. L'activité anticellulaire de l'AmB varie sous l'influence de tous ces facteurs (Graybill *et al.* 1982; Hsu *et al.* 1982). Toutefois, le mécanisme de cette variation n'est pas encore connu.

Pour encapsuler l'AmB on a utilisé aussi les liposomes contenant un stérol.

La présence du cholestérol dans la bicouche solidifie les liposomes. Ils deviennent plus imperméables et moins sensibles à la décomposition par échange de ses constituants avec ceux des lipoprotéines plasmatiques (Scherphof *et al.* 1978).

Si on inclut de l'ergostérol dans des MLV, ces liposomes deviennent hémolytiques même en l'absence d'AmB, car il existe un échange entre les stérols du liposome et ceux du globule rouge (Mehta *et al.* 1984).

Que se passe-t-il avec l'AmB liposomale après injection intraveineuse?

Après injection intraveineuse, les liposomes peuvent suivre différents chemins, par exemple :

- décomposition dans le sang;
- interaction avec les cellules du système MPS (Mononuclear Phagocyte System) qui sont en contact avec le sang, comme les macrophages du foie et de la rate.

Les mécanismes probables de la libération de l'AmB de liposomes sont les suivants:

- Les liposomes relâchent leur contenu vers le milieu extracellulaire, l'antifongique diffuse vers la cellule et est adsorbé à la surface de cette dernière.
- Les liposomes réagissent avec la cellule par phagocytose, comme dans les cas des macrophages et des monocytes, et sont engouffrés dans les phagosomes qui fusionnent avec les lysosomes. Dans le milieu lysosomal, les enzymes détruisent la structure liposomale en libérant le médicament (Ostro *et al.* 1989). Pour les LUV et les MLV, la phagocytose est le mécanisme le plus important du point de vue quantitatif.
- Pendant un échange des lipides entre les liposomes et les lipoprotéines du sérum ou avec la membrane cellulaire, l'AmB est libéré (Ostro *et al.* 1989).

Le facteur principal de la distribution de liposomes après l'administration est leur grandeur. Les plus petits, les SUV sont les plus stables, ont le plus long temps de circulation (jusqu'à 24 heures) et sont peu absorbés par les macrophages. Les liposomes MLV et LUV sont très vite attrapés par les macrophages et leur demi-vie est très courte dans le sang, seulement quelques minutes (Janknegt *et al.* 1992).

La question se pose, quelle est l'activité anticellulaire de l'AmB liposomale?

Dans les études avec les SUV, il a été constaté que la préparation de l'AmB liposomale conduit à un mélange d'AmB liée avec le phospholipide de liposomes et d'AmB non liée, c'est-à-dire de l'AmB étant restée en solution (Jullien *et al.* 1989). Il a été montré que la forme non liée de l'AmB est la forme active.

La capacité de l'antibiotique de faire le lien avec des liposomes dépend :

- du type de phospholipide utilisé et diminue dans l'ordre DMPC>DPPC>DSPC;
- de la présence de cholestérol et diminue quand les liposomes en contiennent;
- de la concentration initiale d'antibiotique utilisée pour la préparation de l'AmB liposomale; le pourcentage d'AmB non liée diminue quand cette concentration augmente (Jullien *et al.* 1990).

En conséquence, l'activité anticellulaire de l'AmB de la préparation liposomale est inversement proportionnelle à la puissance du lien antibiotique-liposome donc, augmente:

- selon l'ordre des phospholipides cité ci-dessus;
- en présence de cholestérol dans la bicouche lipidique;
- avec l'augmentation de concentration de l'AmB non liée aux lipides (Jullien *et al.* 1989).

Hélas, le comportement de l'AmB liposomale n'est pas encore clair. Pour une concentration d'AmB liposomale assez élevée, égale à 10^{-5} M, on n'observe pas d'effet anticellulaire du médicament, malgré le fait que la quantité d'AmB non liée soit suffisante. Il est probable que le très grand nombre de liposomes alors présents cause cet effet. Si le rapport AmB-phospholipide est constant et que la concentration de l'antibiotique augmente, la quantité de phospholipide augmente aussi, ce qui peut provoquer la protection des cellules contre l'action de l'AmB active non-liée (Szoka *et al.* 1987).

La préparation liposomale d'AmB faite de SUV à base de lécithine d'oeuf (EPC), peut détruire les cellules fongiques *in vitro* au même titre que l'antibiotique seul (Jullien *et al.* 1990).

Il est intéressant de constater que les préparations d'AmB liposomale démontrent généralement *in vitro* une activité antifongique réduite (Ahrens *et al.* 1984; Ralph *et al.* 1991), et *in vivo* une activité thérapeutique inférieure à celle de la Fungizone (Clemons *at al.* 1991a et 1991b) pour la même dose de l'AmB. Pourtant, la diminution de la toxicité permet l'administration des doses beaucoup plus élevées ce qui donne les résultats souvent plus avantageux.

Néanmoins, les résultats de nombreuses recherches indiquent l'impossibilité de faire une extrapolation directe des résultats *in vitro* vers *in vivo* (Jullien *et al.* 1990).

Quelle est la toxicité de l'AmB liposomale?

Pour répondre à cette question, il faut choisir un exemple concret car la toxicité comme l'activité antifongique dépendent des conditions de préparation liposomale de l'antibiotique.

La plus souvent utilisée dans les études est la formulation d'AmB liposomale développée par Lopez-Berestein (Lopez-Berestein *et al.* 1983; 1985; 1987) où l'antifongique (2 à 7 % en poids) est encapsulé dans les MLV contenant un mélange de lipides saturés et relativement peu toxiques, avec un rapport molaire DMPC : DMPG égal à 7:3.

Sur les souris, cette préparation liposomale de l'AmB cause une diminution de la toxicité par un facteur de 20 à 30 par rapport à celle de la Fungizone (Juliano *et al.* 1985). Les auteurs ont formulé l'hypothèse que la toxicité sélective de l'AmB liposomale repose sur le transfert sélectif du médicament des liposomes vers la membrane de la cellule fongique, mais non vers les cellules des mammifères. La base biophysique et biochimique de ce phénomène n'est pas claire.

La réduction de la toxicité permet l'administration d'une plus grande dose d'AmB, mais il ne faut pas oublier que ce fait provoquera l'augmentation de la concentration de l'antibiotique dans le foie, les reins, la rate ou les poumons, ce qui peut les endommager.

Si les phospholipides composant les liposomes contiennent des chaînes aliphatiques non saturées, la toxicité de l'AmB liposomale est aussi élevée que celle de la Fungizone.

Malheureusement, il existe toujours le problème de production des solutions de liposomes et le problème de leur stabilité. Pour réduire ces problèmes, on a étudié l'antibiotique incorporé dans des vésicules polymérisées (Mehta *et al.* 1986). Cette méthode n'a pas réduit la toxicité de l'AmB.

Cependant, même si les liposomes présentent un avantage thérapeutique potentiel, leur utilisation se trouve jusqu'à présent limitée car, comme tout complexe macromoléculaire, ils sont éliminés de préférence par le foie où ils s'accumulent (Tableau 3).

Quelques préparations d'AmB liposomale ont été évaluées en clinique et montrent des résultats prometteurs (Lopez-Berestein *et al.* 1985; 1987 et 1989). La formulation optimale pour leur utilisation clinique n'est pas encore établie.

Une autre perspective concernant le transport de l'antibiotique par les liposomes, est celle de diriger les liposomes sélectivement vers un type cellulaire déterminé. Dernièrement, les travaux dans ce sens ont été orientés vers le couplage covalent des anticorps à la surface des liposomes, sans perte de leur spécificité et sans fuite du contenu des liposomes (Hospental D.R. 1989).

L'association des liposomes avec des glycoprotéines, des glycolipides ou avec d'autres ligands leur conférant une spécificité, devrait étendre leur potentiel thérapeutique.

Une très récente formulation liposomale de l'AmB, nommée AmBisome, présente une plus grande efficacité par rapport à la Fungizone dans le traitement des candidiases systémiques. Elle contient 10 % en moles de l'antibiotique. En clinique, dans certains cas, l'AmBisome peut remplacer l'AmB, particulièrement quand le patient ne répond pas au traitement à la Fungizone (Chopra *et al.* 1991).

Tableau 3
Distribution de l'AmB chez la souris après une injection d'AmB liposomale (ABLC) ou de Fungizone (d'après Clark *et al.* 1991)

Tissue or plasma	Time (h)	AmB concn ($\mu\text{g/g}$)		
		ABLC (10 mg/kg)	ABLC (1 mg/kg)	Fungizone (1 mg/kg)
Liver	1	123.2	14.8	6.8
	6	128.2	15.5	13.8
	24	128.3	19.5	5.3
Spleen	1	141.1	10.0	2.1
	6	101.1	9.4	6.0
	24	104.2	8.4	4.2
Lung	1	70.7	9.9	4.2
	6	29.5	6.2	5.5
	24	8.7	<2.0	<2.0
Kidney	1	6.5	<2.0	3.5
	6	3.4	<2.0	<2.0
	24	2.3	<2.0	<2.0
Brain	1	2.0	<2.0	<2.0
	6	<2.0	<2.0	<2.0
	24	<2.0	<2.0	<2.0
Plasma ^a	1	1.7	0.4	1.7
	6	<0.4	0.5	0.8
	24	0.5	<0.4	1.2

^a Les concentrations d'AmB sont en $\mu\text{g/ml}$.

Malgré la valeur de LD_{50} de 175 mg/kg pour l'AmBisome (chez les souris) qui est 76 fois plus grande que celle de la Fungizone, il existe un danger réel de

dommage au cerveau après l'administration de doses supérieures à 5 mg/kg (Proffitt *et al.* 1991).

2.3.3.2 Complexe amphotéricineB-lipide

ABLC, le complexe AmB-lipide, est un dérivé de la formulation d'AmB liposomale de Lopez-Berestein, composé de DMPC et de DMPG. Dans ces préparations, le rapport molaire de deux phospholipides est le même avec une valeur de 7 : 3. La concentration d'AmB dans la formulation ABLC est de 33% en moles, donc presque sept fois plus élevée que dans les liposomes MLV de Lopez-Berestein. Cette différence est à la base de la formation d'une structure "en ruban" contrairement à la forme sphérique de liposomes originaux (Janoff A.S. 1990).

La facilité de produire cette nouvelle formulation d'AmB commercialement est son plus grand atout, ce que l'AmB liposomale de Lopez-Berestein ne possède pas.

Les résultats de quelques études montrent une semblable activité antifongique pour l'ABLC et pour la Fungizone. Dans d'autres études, on remarque une réduction de l'activité allant jusqu'à quatre fois (Clark *et al.* 1991).

En général, l'indice thérapeutique de la nouvelle formulation d'AmB est plus grand que celui de l'AmB commerciale à cause de plus basse toxicité ce qui est confirmé par les études cliniques. Les effets secondaires sont moins prononcés.

2.3.3.3 Complexe amphotéricine B-sulfate de cholestérol

Tout récemment, on parle de la nouvelle préparation d'AmB connue sous le nom d'Amphosil ou d'ABCD, et qui est une dispersion colloïdale de

l'antibiotique avec le sulfate de cholestérol (dérivé métabolique du cholestérol). Ce complexe multimoléculaire, dont le rapport moléculaire AmB - sulfate de cholestérol est de 1 : 1, a la forme d'un disque de 143 ± 36 nm de diamètre et de 5 nm d'épaisseur, sans eau à l'intérieur. Donc, il diffère beaucoup de la forme sphérique des liposomes et de la forme en ruban de l'agrégat AmB-phospholipide (Guo *et al.* 1991). Dans l'ABCD en forme de disque, les molécules d'AmB composent un bouclier sur les côtés du disque d'une telle manière, que les sept groupements hydroxyles de chaque molécule s'orientent vers le milieu aqueux.

Ce complexe n'hémolyse pas les érythrocytes et il entre en faible interaction avec les lipoprotéines du sérum *in vitro*. Ainsi, l'ABCD constitue un bon protecteur pour les cellules animales.

En clinique, pour le traitement des *Coccidioides immitis*, la Fungizone est de deux à quatre fois plus efficace que l'Amphosil, mais aussi de cinq à huit fois plus toxique que ce dernier (Patterson *et al.* 1989). Par contre, l'administration de l'Amphosil provoque fréquemment des effets secondaires très ennuyeux.

2.3.3.4. Amphotéricine B en émulsion.

On peut définir l'émulsion comme un mélange hétérogène de deux ou plusieurs phases qui ne se mélangent pas, avec un stabilisateur, c'est-à-dire un composant qui stabilise les gouttelettes dispersées.

En 1987, Davis et ses collaborateurs ont déposé un brevet pour la préparation des émulsions d'huile de soya avec l'AmB (Davis *et al.* 1987). Selon leur méthode, l'AmB a été dissoute dans le méthanol et mélangée avec de la lécithine d'oeuf dissoute dans l'eau. Le méthanol a été évaporé. Ils ont ensuite ajouté l'huile de soya et ont procédé à l'émulsification en utilisant une sonde

ultrasonique. L'AmB en émulsion injectée aux souris, a donné de bons résultats. La dose maximale tolérée de Fungizone pour une souris infectée est de 1,0 mg/kg, alors que pour l'AmB en émulsion elle est de 9,0 mg/kg, donc 9 fois plus grande.

En résumé, les résultats thérapeutiques de l'administration d'AmB dans cette émulsion sont similaires aux résultats de l'utilisation de l'AmB liposomale.

Suite aux recherches du groupe de Davis, une nouvelle émulsion a vu le jour. Il s'agit d'une émulsion de l'AmB dans l'Intralipide 20 % (Kirsh *et al.* 1988). Elle est efficace et mieux tolérée que la Fungizone dans le cas des cryptococcosis chez la souris (Joly *et al.* 1991). Dans le traitement de candidiasis chez l'homme, elle s'est avérée moins néphrotoxique que l'AmB conventionnelle (Caillot *et al.* 1993).

2.3.4 Modulation de la solubilité de l'amphotéricine B

Pour rendre l'AmB plus soluble dans l'eau, donc plus facile à administrer par injection intraveineuse, les études ont été dirigées vers :

- la préparation de dérivés solubles de l'AmB ,
- la formation de complexes avec l'AmB,
- la préparation de l'antibiotique entouré par des molécules de surfactant.

Les formulations plus solubles que l'AmB seule ont été testées, bien sûr, du point de vue de l'activité antifongique et de la toxicité.

2.3.4.1. Dérivés de l'amphotéricine B

Dans les travaux de Strauss (Strauss G. 1981), l'interaction d'un dérivé d'AmB a été étudiée avec des modèles membranaires. L'auteur a préparé le

borate de l'AmB sous la forme d'un complexe AmB - borax ($N_2B_4O_7$). Le borate est 100 fois plus soluble dans l'eau que l'AmB. En solution aqueuse, il existe partiellement comme monomère et sous forme de copolymère (polyèneborate) en chaîne contenant près de 100 monomères. La fraction molaire du monomère varie avec le changement de concentration. Le borate de l'AmB possède 80 % d'activité biologique de l'AmB et réagit avec les membranes lipidiques de la même façon que l'antibiotique seul.

D'autres études sur l'interaction du borate de l'AmB ainsi que d'un autre dérivé d'AmB, l'ester méthylique, avec des vésicules contenant du cholestérol ou de l'ergostérol, ont aussi été réalisées (Readio *et al.* 1982). Les résultats montrent que le borate possède moins d'affinité envers les stérols que l'AmB seule et ne présente aucune sélectivité dans ses réactions.

Les dérivés synthétiques de l'AmB sont généralement très solubles dans l'eau, surtout l'ester méthylique de l'AmB qui à quantité équivalente, est moins actif et moins toxique que la Fungizone. La description plus détaillée des dérivés de l'AmB et de leur comportement se trouve dans le chapitre 2.3.1.

2.3.4.2. Complexation de l'amphotéricine B

Pour augmenter la solubilité de l'AmB dans l'eau et diminuer sa tendance à l'agréation, un groupe de chercheurs hongrois (Kajtar *et al.* 1989), a obtenu des résultats satisfaisants. Ils ont travaillé sur la solubilisation de l'AmB dans l'eau sans modification de la structure du polyène. Ils ont préparé l'AmB sous forme de complexe avec la γ -cyclodextrine (γ -CDx), (Figure 9).

Ce complexe, dans lequel le rapport molaire AmB : CDx est de 1 : 136, est une poudre amorphe, très soluble dans l'eau, stable dans une gamme de pH

variant de 1,2 à 12. Sous forme de complexe avec la γ -CDx, l'AmB retient son activité anticellulaire.

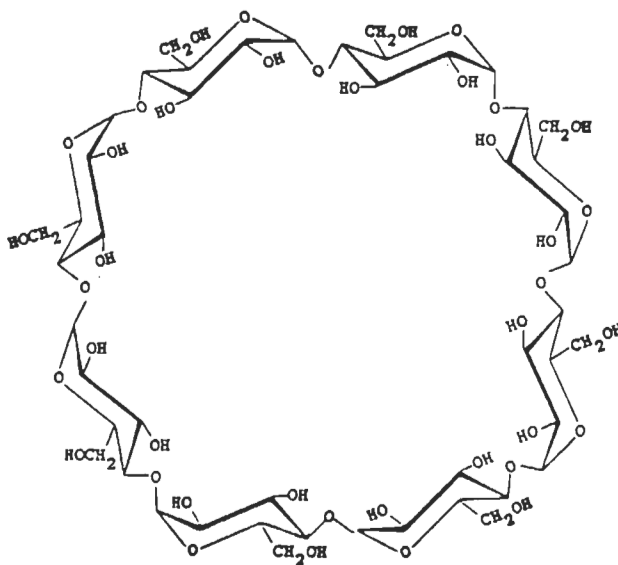


Figure 9. Structure de la γ -cyclodextrine

Cette formulation de l'AmB, par sa meilleure solubilité dans l'eau, est plus facile à administrer, mais la toxicité de l'antibiotique n'est pas diminuée.

2.3.4.3. Surfactants et l'amphotéricine B

De nombreuses études ont montré que les surfactants peuvent moduler l'activité d'un médicament. Cette modification peut être liée aux changements de la solubilité du médicament, de son absorption, de sa distribution ou de ses liaisons avec les composants de la cellule (Attwood *et al.* 1983).

Par définition, le surfactant est un amphiphile soluble dans l'eau (Helenius *et al.* 1975). Quand la concentration de surfactant en forme de monomère devient critique (concentration micellaire critique, CMC), le surplus forme des micelles.

Les micelles sont des agrégats colloïdaux thermodynamiquement stables dont la forme et le nombre d'agrégation sont bien déterminés. On peut comparer la région de la CMC à un phénomène de changement de phase.

L'utilisation des sels biliaires pour solubiliser des composés pratiquement non solubles dans l'eau, est déjà bien connue (Lichtenberg *et al.* 1983). Il a été démontré que sur le diagramme de phases du système contenant un sel biliaire et des phospholipides, il existe une région qui correspond à la coexistence des micelles mixtes, ou le phospholipide est solubilisé dans les micelles du surfactant, et des micelles du surfactant pur (Mazer *et al.* 1980). Cette propriété, et la compatibilité des sels biliaires avec l'organisme humain, ont décidé de leur utilisation dans le cas de l'AmB.

L'amphotéricine B et le déoxycholate de sodium

Comme il a été déjà mentionné, la forme commerciale de l'AmB, la Fungizone, est préparée à partir d'un mélange du médicament avec un sel biliaire, le déoxycholate de sodium (DOC), pour rendre le médicament plus soluble et plus facile à administrer. Le rapport molaire de l'AmB au DOC dans la Fungizone est de 1 : 2.

Le DOC est un surfactant ionique, car il possède un groupement carboxylate situé à l'extrémité de la chaîne aliphatique, très courte et flexible (Figure 10). La présence de deux hydroxyles d'un côté de la molécule entraîne une grande affinité qui permet de former l'association avec la deuxième molécule de DOC, protégeant de cette façon la partie cyclique hydrophobe. La structure micellaire est donc stabilisée par interaction hydrophobe et a la forme d'un canal irrégulier où les groupements carboxylate et hydroxyle se dirigent vers l'extérieur de la structure (Seok Jou *et al.* 1991). Les dimensions du canal sont telles que la

molécule de phospholipide ou de cholestérol, peuvent être incorporées dans les micelles de DOC. Une micelle contient de 4 à 11 molécules de DOC (Lamy-Freund *et al.* 1991).

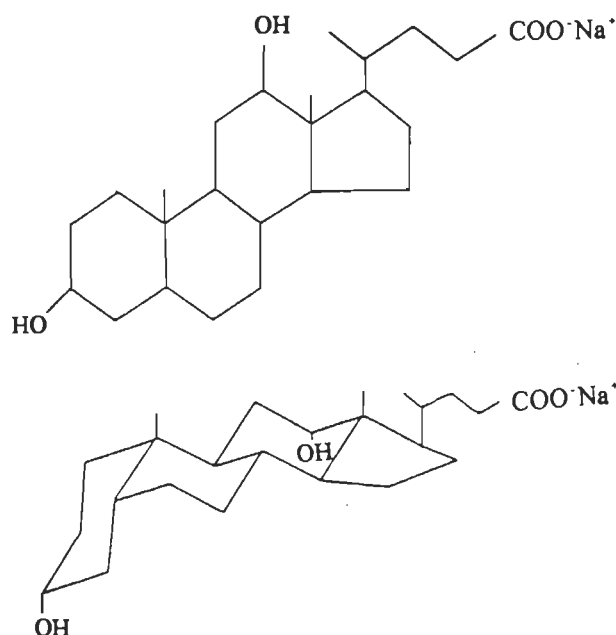


Figure 10. Structure du déoxycholate de sodium

L'organisation du système AmB-DOC de la Fungizone au niveau moléculaire n'est pas connue (Lamy-Freund *et al.* 1989). Quelques résultats intéressants des études sur la Fungizone obtenus par un groupe de chercheurs (Lamy-Freund *et al.* 1989 et 1991) grâce à la méthode de RPE et l'utilisation de la sonde 5-SASL, révèlent la présence, dans la solution aqueuse, d'agrégats mixtes AmB-DOC et de micelles de DOC, dont le nombre varie selon la concentration de DOC. Malheureusement, le grand inconvénient de cette méthode est la concentration très élevée (de $1,3 \times 10^{-3}$ M à $2,0 \times 10^{-2}$ M) d'AmB nécessaire pour faire ces mesures, 100 fois plus grande que celle utilisée dans le traitement thérapeutique. Les auteurs trouvent une grandeur des formes d'agrégats mixtes AmB-DOC de

1500 nm de diamètre pour la concentration de Fungizone de 10^{-2} M (Lamy-Freund *et al.* 1991).

Les études faites pour la Fungizone (10^{-4} M) dans les solutions eau-éthanol révèlent l'existence d'agrégats d'AmB de 60 nm de diamètre, comprenant chacun 2000 molécules du polyène (Rinnert *et al.* 1977). On ne parle pas ici de la présence du DOC dans ces agrégats.

Le mécanisme d'interaction de l'AmB en mélange avec le DOC au niveau membranaire n'est pas clair. Il semble qu'après administration intraveineuse, les micelles mixtes AmB-DOC se dissocient rapidement (Edmonds *et al.* 1989), et qu'il y a formation de liaison entre l'AmB d'une part et le cholestérol de la membrane cellulaire ou de la surface des lipoprotéines plasmatiques de l'autre (Brajtburg *et al.* 1984).

En mélangeant l'AmB avec le DOC on améliore la solubilité de l'antifongique. Par ailleurs, l'utilisation clinique de cette formulation d'AmB est limitée par des effets secondaires, incluant fièvre, nausée, frissons, vomissements, anémie et effets toxiques à long terme dont la néphrotoxicité est la plus dangereuse. Cela limite la dose utilisable du médicament (Guo *et al.* 1991).

L'amphotéricine B et les esters du sucrose

Il a été récemment découvert que la présence du monolaurate de sucrose (LS) influence la sélectivité de l'interaction de l'AmB avec les stérols (Gruda *et al.* 1988b).

Les esters de sucrose, groupe auquel le LS appartient, ont été décrits par Osipov et ses collaborateurs (Osipov *et al.* 1956). Quand le degré d'estérification n'est pas trop élevé, par exemple mono- ou di-, ces esters présentent un caractère

de surfactants. Grâce à leur propriété particulière, ils jouent un rôle de séparateur entre les phospholipides et les protéines, mais sont aussi capables de simuler l'environnement naturel des protéines. Il a été montré que le comportement des esters de sucrose est plus proche du comportement des phospholipides que de celui d'autres détergents, comme la Digitonine ou le Tween 80 (Nashima *et al.* 1980).

Le LS possède une plus grande efficacité quant à l'extraction des protéines membranaires des érythrocytes bovins que le Triton X-100, un détergent très puissant. La stabilité thermique des protéines solubilisées par le LS est excellente.

Le LS est un surfactant non ionique. En particulier, il est utilisé comme additif alimentaire (Brochure "Ryoto Sugar Ester; Technical Information"). La molécule contient une partie de sucre et une chaîne aliphatique (Figure 11).

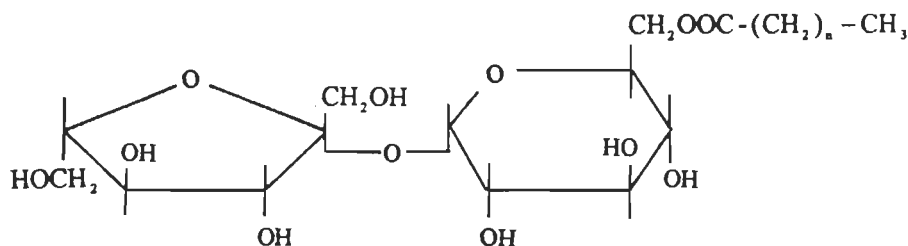


Figure 11. Structure d'un ester de sucrose (laurate de sucrose, $n=10$)

Les groupements hydroxyles du LS se lient facilement avec les molécules d'eau par liaison hydrogène. L'eau d'hydratation se trouve près de la limite entre la partie hydrophobe et la partie hydrophile d'une micelle de LS. La valeur de la CMC du LS mesurée par Herrington (Herrington *et al.* 1986) est de 3.4×10^{-4} M. Le nombre d'aggrégation calculé montre que 96 molécules de LS forment une

micelle (Kawaguchi T *et al.* 1991). Les micelles ont une forme ellipsoïdale. On ne note pas de changement significatif du nombre d'agrégation avec l'augmentation de la température.

Le LS comme surfactant non-ionique, ne possède pas de groupements chargés qui affaiblissent la formation des micelles; c'est pourquoi sa CMC est beaucoup plus basse que celle des surfactants ioniques. Le pH n'a aucun effet sur les surfactants non-ioniques.

La présence de LS provoque un changement de l'état physique de l'AmB qui est bien reflété par le spectre d'absorption électronique. Pour une concentration de LS bien précise, l'intensité de la bande d'absorption à 409 nm, caractéristique pour la forme monomère de l'AmB, augmente. Par contre, l'intensité de la bande à 347 nm, caractéristique pour l'AmB agrégée, diminue, tout comme la composante à 328 nm. Ces résultats témoignent du fait que la forme monomère d'AmB s'enrichit et que les agrégats de l'antibiotique disparaissent en présence de LS.

Les résultats des spectres d'absorption électronique des solutions aqueuses d'AmB avec différentes concentrations de LS ont permis de formuler l'hypothèse, selon laquelle l'ensemble AmB-LS est plus sélectif que l'AmB pure dans son interaction avec les deux stérols, l'ergostérol et le cholestérol (Gruda *et al.* 1988b). Le rapport de l'absorbance à 409 nm sur l'absorbance à 347 nm (R) a été utilisé comme mesure de l'interaction entre l'AmB et le stérol (Gruda *et al.* 1980). R diminue avec l'augmentation d'interaction AmB-stérol (Figure 12).

La différence entre la valeur de R pour l'AmB-cholestérol et la valeur de R pour l'AmB-ergostérol (ΔR), dans les mêmes concentrations de LS, reflète bien la sélectivité d'interaction de l'AmB avec les stérols (Figure 13).

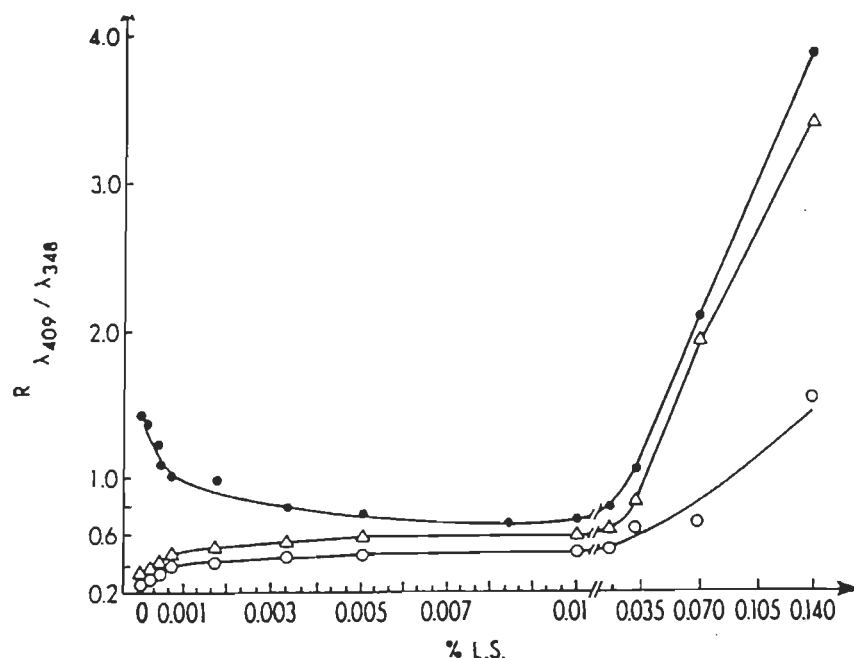


Figure 12. Effet du LS sur le rapport d'absorbances R ($R = A_{409} : A_{347}$) de solutions d'AmB dans le propanol 6,5 %. La concentration d'AmB est de $6,5 \times 10^{-6}$ M. Sans stérol (●); $6,5 \times 10^{-6}$ M de cholestérol (Δ) ; $6,5 \times 10^{-6}$ M d'ergostérol (o) (d'après Brajtburg *et al.* 1989)

Cette sélectivité se reflète également dans les effets anticellulaires. Une série d'expériences avec les érythrocytes et les cellules L-929 provenant de souris, ainsi qu'avec une culture de cellules de *Candida albicans*, a montré que la présence de LS permet de diminuer la toxicité de l'AmB envers les érythrocytes et les cellules L-929 sans affaiblir la toxicité du médicament envers les cellules de champignons (Gruda *et al.* 1988b). Des résultats similaires ont été obtenus pour les érythrocytes humains.

En conclusion, la concentration de LS qui est responsable du même degré d'inhibition de la toxicité de l'AmB, est 1 000 fois plus grande *in vitro* pour les cellules fongiques que pour les érythrocytes (Gruda *et al.* 1988b).

Une autre étude montre que l'effet anticellulaire de l'AmB (sous forme de Fungizone) augmente à des concentrations très faibles de LS, et diminue à des concentrations plus grandes de ce surfactant (Brajtburg *et al.* 1989), alors la présence du LS a un double effet sur la toxicité de l'AmB. Cet effet ne dépend pas de la concentration d'AmB.

Les autres surfactants de la même famille des esters de sucrose modifient de la même façon la sélectivité de l'AmB (Figure 13).

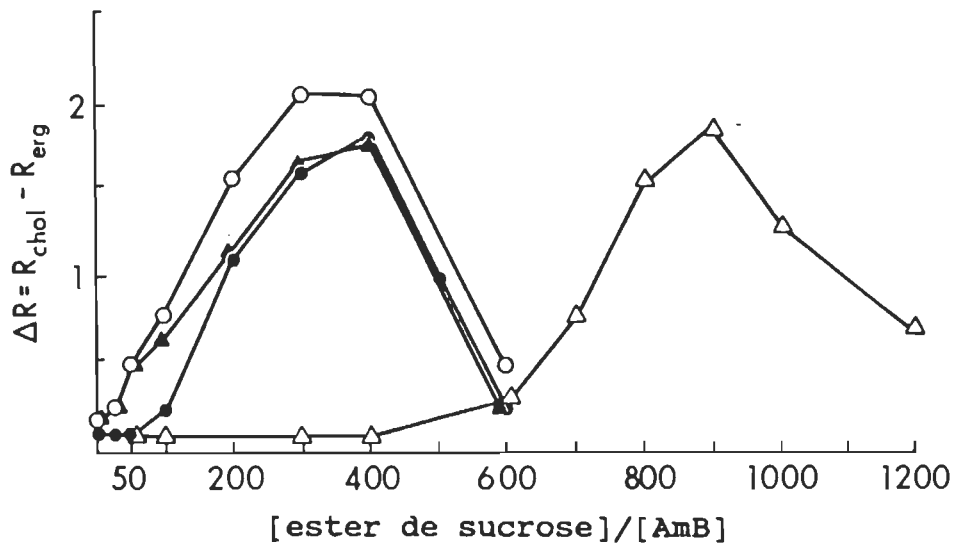


Figure 13. Sélectivité d'interaction AmB-stérols (ΔR) en présence de quatre esters de sucrose: palmitate(o), myristate(▲), laurate(●), caprate (Δ), (d'après Gruda *et al.* 1991)

Le maximum de chaque courbe correspond à la sélectivité d'interaction maximale de l'AmB avec les stérols. Évidemment, une plus grande sélectivité de l'AmB peut permettre d'augmenter la dose administrée, ce qui est très souhaitable dans le traitement de nombreuses mycoses systémiques.

3. OBJECTIFS DU TRAVAIL

La relativement grande toxicité de l'AmB et son incontestable efficacité dans le traitement des mycoses systémiques ont suscité l'intérêt de nombreux chercheurs. L'apparition de nouvelles préparations d'AmB ajoute de nouveaux problèmes comme la stabilité du produit et des effets secondaires additionnels. Dans cette perspective, une meilleure compréhension du mode d'action de l'AmB et des mécanismes mis en jeu dans ses effets toxiques est indispensable.

Des études préliminaires semblent indiquer que de nombreux additifs peuvent moduler la sélectivité de l'AmB et on peut supposer que le mécanisme de cette modulation est identique ou semblable dans tous les cas étudiés. De plus, cette modification de la toxicité sélective de l'AmB semble être liée à l'état d'agrégation de l'antibiotique. La pertinence de la vérification de cette hypothèse est à l'origine de notre travail.

Dans ce contexte, nous nous sommes proposés d'étudier le mécanisme de l'effet de surfactants sur la toxicité sélective de cet antibiotique polyénique.

Ce travail est divisé en quatre parties :

1° Étude de l'effet des surfactants sur l'état d'agrégation de l'AmB et sur sa sélectivité envers les stérols ayant comme objectif d'élucider le rôle que joue un surfactant dans l'interaction avec l'antibiotique, par quel mécanisme la modification de l'activité sélective de l'AmB s'effectue ainsi

que, quelles sont les exigences pour que l'antibiotique en présence de surfactant soit moins toxique.

2° Étude de l'effet des surfactants sur l'interaction de l'AmB avec des lipoprotéines ou avec le sérum qui permettrait la vérification du comportement de l'antibiotique entouré par des molécules de surfactant en même milieu dans lequel il est transporté dans l'organisme.

3° Étude de l'effet des surfactants sur la toxicité aiguë de l'AmB chez les souris dans le but de trouver la meilleure corrélation entre l'état physique de l'AmB et sa toxicité *in vivo*.

4° Étude de l'organisation spontanée de l'AmB en milieu aqueux en vue de proposer un modèle qui servirait à l'interprétation de la corrélation entre les résultats obtenus *in vitro* et ceux de l'étude *in vivo* et à émettre une hypothèse du mécanisme de la toxicité de l'AmB.

4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

Cette partie du travail contient la méthodologie de la partie expérimentale, la description des résultats obtenus pendant l'expérimentation et leur discussion.

4.1 Étude du comportement de l'amphotéricine B en présence des surfactants

Sachant que, dans la Fungizone, l'AmB est en mélange avec le DOC qui fait partie des surfactants ioniques, et qu'un groupe de surfactants non ioniques, les esters de sucrose, influence fortement la sélectivité de l'interaction de l'AmB avec l'ergostérol par rapport au cholestérol (voir le chapitre 2.3.4.3) et la toxicité cellulaire de l'AmB sous forme de Fungizone, nous avons espéré élucider le comportement de l'antibiotique en présence de surfactants et trouver les conditions dans lesquelles l'antibiotique serait moins toxique.

4.1.1 Méthodologie

La méthodologie de cette étape de la présente étude comprend des méthodes physico-chimiques souvent utilisées et choisies en fonction des résultats déjà obtenus et des problèmes qui sont apparus en cours d'étude.

Les questions à répondre et les points à éclaircir ont guidé notre choix des méthodes d'analyse.

Comme il a été déjà mentionné au chapitre 2.2.1, le meilleur outil pour examiner l'AmB, un polyène exemplaire, est la spectroscopie d'absorption UV-

VIS et le DC. Les spectres obtenus pourraient bien refléter l'effet des surfactants sur l'état d'agrégation de l'AmB et sur la sélectivité dans son interaction avec le cholestérol ou l'ergostérol. Le problème des changements du spectre UV-VIS, dû à un processus d'agrégation ou de désagrégation et à un couplage excitonique des transitions du chromophore, semble être intéressant à étudier par le DC, une des meilleures méthodes pour détecter le couplage excitonique (Chéron *et al.* 1981).

Malheureusement, il existe deux phénomènes qui peuvent affecter les signaux d'absorption UV-VIS et dichroïques. Ce sont :

- la diffusion de la lumière

Une partie de la lumière incidente est diffusée dans toutes les directions par les particules en suspension et elle est comptée comme une absorption qui vient s'ajouter à l'absorption vraie des chromophores. Sur les spectres, cette diffusion se traduit par une courbe croissante en fonction de la diminution de la longueur d'onde à la quatrième puissance. La courbe d'absorption du chromophore et celle de la diffusion se superposent.

- l'effet Duysens

Il s'agit d'une réduction de l'absorption pour une longueur d'onde donnée; l'absorption d'une suspension de chromophores est plus basse que l'absorption de la solution limpide de ces mêmes chromophores à la même concentration. Sa présence ou son apparition peut suggérer une augmentation de l'agrégation ou un agrandissement des formes présentes en solution (Bustamante *et al.* 1983).

Dans le but de faciliter l'interprétation des spectres d'absorption, nous allons nous servir de la méthode de diffusion de la lumière et de l'ultracentrifugation qui peuvent nous permettre de clarifier le processus d'agrégation et de la micellisation.

Puis, utilisant la méthode de diffusion quasi élastique de la lumière, nous pourrons connaître la grandeur des formes présentes dans la solution étudiée.

Par la suite, la méthode de chromatographie d'exclusion par la taille permettra d'éclaircir l'emplacement des molécules d'AmB monomérique dans la solution micellaire du surfactant.

Les données pour tout le matériel chimique utilisé pendant l'étude sont présentées dans l'Annexe A.

Les renseignements sur l'appareillage et la description du procédé analytique pour chaque méthode utilisée se trouvent à l'Annexe B.

4.1.2 Choix des surfactants

Le facteur principal dans notre choix des surfactants était le manque de la toxicité pour l'organisme animal. Nous avons choisi les surfactants suivants :

- le DOC, bien connu comme un sel biliaire et composant de la Fungizone (voir le chapitre 2.3.4.3);
- le LS, un des esters de sucrose qui a donné des résultats prometteurs étudié en mélange avec l'AmB (voir le chapitre 2.3.4.4), non toxique lorsqu'administré par voie orale, et un peu plus toxique par voie intraveineuse;
- le Tween 80, un surfactant non ionique, très peu toxique par voie intraveineuse;
- le F6C2MALT-1, un nouveau surfactant non ionique, peu hémolytique;
- le Hecameg, un nouveau surfactant non ionique, très peu connu;

- la γ -cyclodextrine, qui n'appartient pas au groupe des surfactants mais dont la présence en solution aqueuse de l'AmB augmente la solubilité de l'antibiotique.

Les structures moléculaires de DOC, de LS et de γ -cyclodextrine sont présentées aux figures 9, 10 et 11. La Figure 14 montre la structure moléculaire pour les autres surfactants cités.

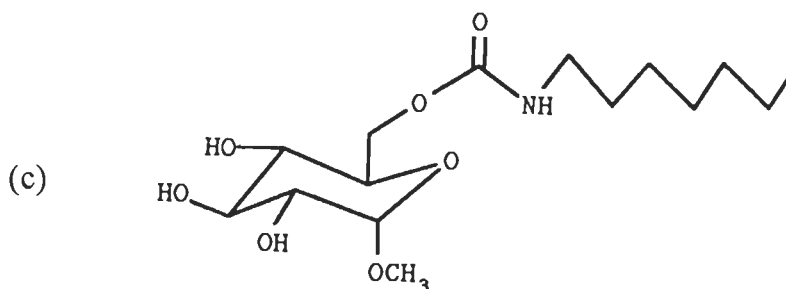
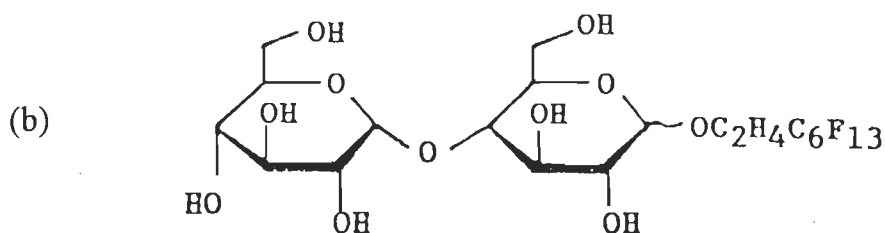
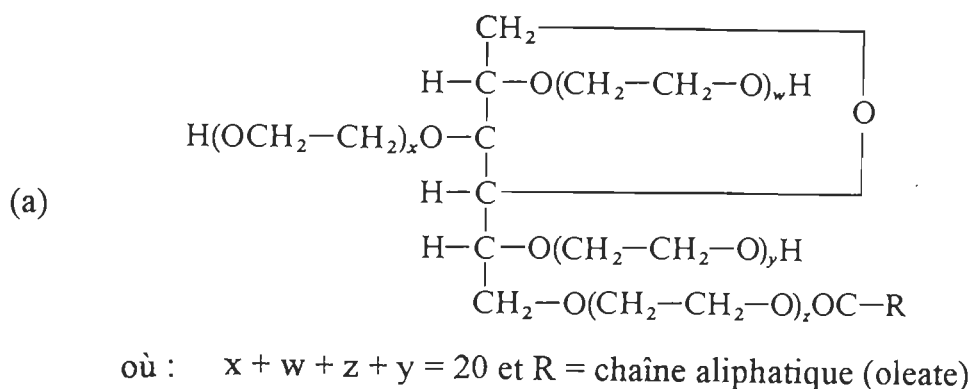


Figure 14. Structure moléculaire de Tween 80 (a), de F6C2MALT-1 (b) et de Hecameg (c)

Le F6C2MALT-1 et le Hecameg ont été étudiés principalement sur les animaux (voir le chapitre 4.3).

4.1.3 Effet de surfactants sur l'état d'agrégation de l'amphotéricine B

4.1.3.1 Concentration micellaire critique (CMC) des composés purs

Les études ont débuté par la mesure de la CMC du DOC dans une solution tampon phosphate (pH=7,4). Parallèlement, les valeurs de CMC pour l'AmB et pour le LS en solution aqueuse ont été obtenues.

Méthode de diffusion de la lumière

La méthode de diffusion de la lumière a permis de déterminer les CMC (voir l'Annexe B-(3)). La Figure 15, où l'intensité de diffusion de la lumière (en unités arbitraires) est présentée en fonction du logarithme des concentrations de surfactant, montre le résultat obtenu pour le DOC.

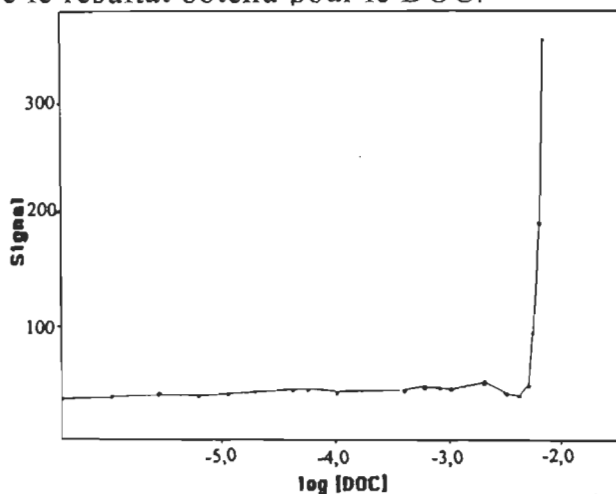


Figure 15. CMC du DOC dans une solution tampon phosphate (pH=7.4). Le résultat présenté est la moyenne de trois mesures sur différentes solutions de DOC

Le signal augmente soudainement quand les micelles commencent à se former. La concentration pour laquelle le signal de diffusion de la lumière est pour la première fois plus grand que le signal de base correspond à la formation des micelles. La valeur de la CMC se mesure à l'intersection des deux droites tirées à partir de la courbe et, dans le cas du DOC, est de $4,5 \times 10^{-3}$ M. Les solutions aqueuses de l'AmB pure et du LS pur, examinées de la même façon, ont donné des courbes de même caractère que celle du DOC.

Il est évident que l'AmB n'est pas un surfactant et que la CMC peut être, dans ce cas-ci, interprétée comme le début de l'agrégation. L'agrégation du polyène semble se produire selon les deux étapes suivantes :

- la formation d'oligomères, les plus petites formes agrégées qui correspondent aux micelles des surfactants;
- l'agrégation des oligomères.

Pour différencier les micelles du surfactant des "micelles" de l'AmB, ces dernières seront nommées agrégats-micelles ou agrégats, tout simplement.

Nos résultats de CMC sont présentés et comparés avec ceux cités dans la littérature et obtenus par des méthodes différentes (Tableau 4).

Tableau 4

Concentrations micellaires critiques de l'AmB, du DOC et du LS

Composé	CMC (en M)	CMC (en M) (littérature)	Référence
AmB	$6,0 \times 10^{-7}$	-	
LS	$6,3 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-4}$	Makino at al. 1983
DOC	$4,5 \times 10^{-3}$	$(4,0 \div 6,0) \times 10^{-3}$	Helenius at al. 1975

La détermination de la CMC par la méthode de diffusion de la lumière a donné des résultats très proches de ceux obtenus par d'autres techniques, en validant notre choix de cette méthode de mesure.

4.1.3.2 Effet du déoxycholate de sodium sur l'état d'agrégation de l'AmB

Il est bien connu que l'addition de DOC à l'AmB permet d'augmenter la solubilité de l'antibiotique dans l'eau et est à la base de la préparation thérapeutique, la Fungizone. Pour savoir si le DOC exerce un effet sur l'état d'agrégation de l'AmB, les solutions aqueuses de quatre concentrations d'AmB ont été choisies pour l'étude par la diffusion de la lumière.

Méthode de diffusion de la lumière

Les résultats obtenus en fonction de différentes concentrations du DOC, sont présentés sur la Figure 16. Une des concentrations d'AmB ($1,0 \times 10^{-7}$ M) est en dessous de sa CMC, par contre les autres ont été choisies au dessus de la CMC ($1,5 \times 10^{-6}$ M; $6,5 \times 10^{-6}$ M; $2,5 \times 10^{-5}$ M). La Figure 16 montre que les courbes sont complètement différentes pour ces deux types de solution.

Il faut ajouter que les deux premières concentrations d'AmB au-dessus de sa CMC correspondent à la même région de concentrations qui ont été utilisées dans les études *in vitro* avec des cellules. La dernière concentration d'AmB représente celle qu'on trouve dans les solutions thérapeutiques de Fungizone.

Quand la concentration d'AmB est en dessous de sa CMC, le signal de diffusion de la lumière au début est faible, et correspond au signal du solvant pur. Le signal commence à augmenter rapidement, exactement à la CMC de DOC pur.

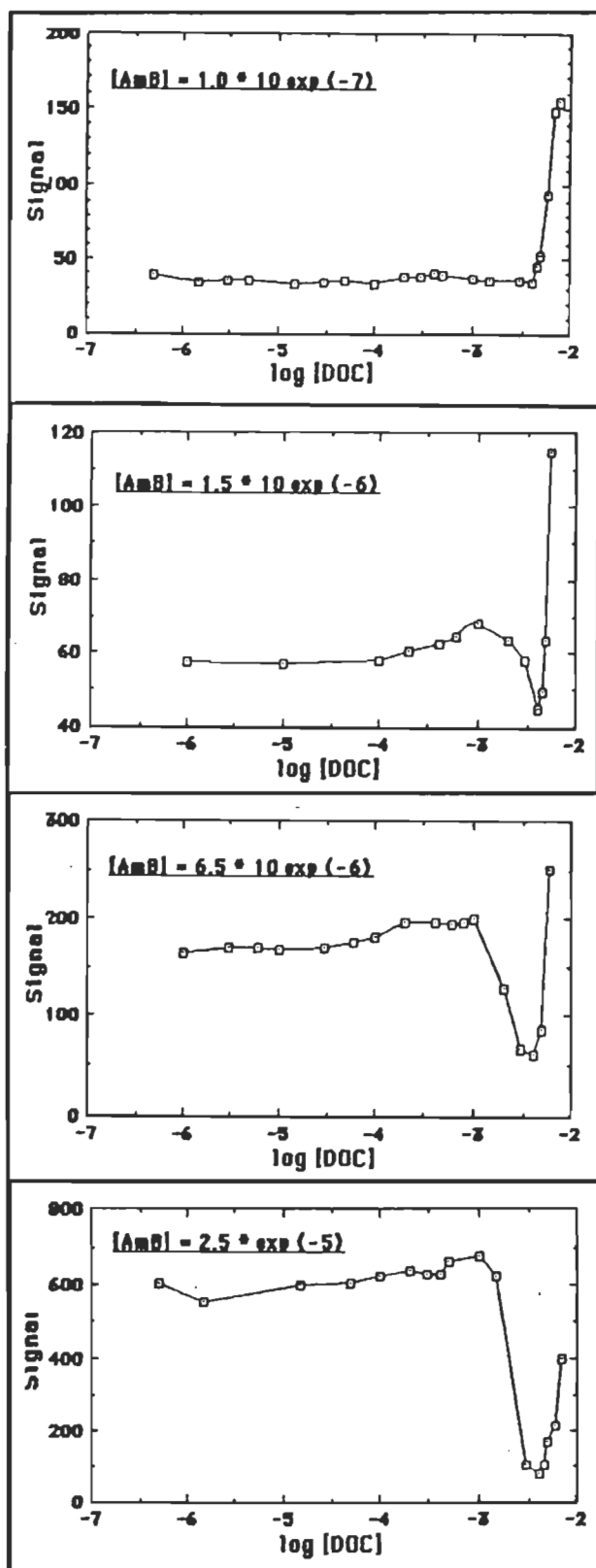


Figure 16. Effet du DOC sur la diffusion de la lumière des solutions aqueuses d'AmB à quatre concentrations différentes

Quand la concentration d'AmB est au-dessus de sa CMC, le signal de diffusion de la lumière initial, résultant de la présence des agrégats-micelles d'AmB dans la solution, est élevé par rapport au cas précédent. Avec la hausse de la concentration de DOC il y a d'abord une petite augmentation du signal, suivie d'une chute jusqu'au niveau du signal du solvant pur et ensuite d'une augmentation très rapide.

Pour toutes les concentrations d'AmB, le minimum du signal de diffusion de la lumière correspond à la CMC de DOC pure, c'est-à-dire $4,5 \times 10^{-3}$ M. Ainsi, il est évident que l'état d'agrégation de l'AmB peut être modifié par la présence du DOC dans la solution. Quand on commence à ajouter le DOC aux agrégats-micelles d'AmB, il est probable que les molécules de DOC pénètrent dans les agrégats-micelles de l'AmB et les entourent, augmentant ainsi leurs dimensions, ce qui provoque la première faible hausse du signal de diffusion de la lumière. L'ajout de quantités plus grandes de DOC détruit complètement la structure des micelles mixtes, ce qui correspond à la chute du signal jusqu'à son minimum. Quand on augmente encore la concentration de surfactant, les micelles du surfactant commencent à se former, et on observe une hausse rapide de la diffusion de la lumière.

Des informations additionnelles quand à l'effet de l'environnement sur l'état d'agrégation de l'AmB ont été obtenues à partir des spectres d'absorption électronique des différentes solutions d'AmB en mélange avec le DOC.

Spectroscopie d'absorption UV-VIS

La description de cette méthode se trouve dans l'Annexe B-(1).

Il a été montré que les changements dans l'environnement des molécules de l'antibiotique, causés par son agrégation ou par association avec les molécules

d'autres composés, se reflètent dans les changements du spectre d'absorption électronique de l'AmB (Brajtburg *et al.* 1989; Ernst *et al.* 1981; Gruda *et al.* 1988a; Srauss G. 1981). La Figure 17 montre les résultats typiques obtenus pour une concentration constante d'AmB de $2,5 \times 10^{-5}$ M (au dessus de sa CMC), en mélange avec quatre différentes concentrations de DOC ($6,0 \times 10^{-6}$ M; $1,0 \times 10^{-3}$ M; $4,0 \times 10^{-3}$ M; $7,0 \times 10^{-3}$ M).

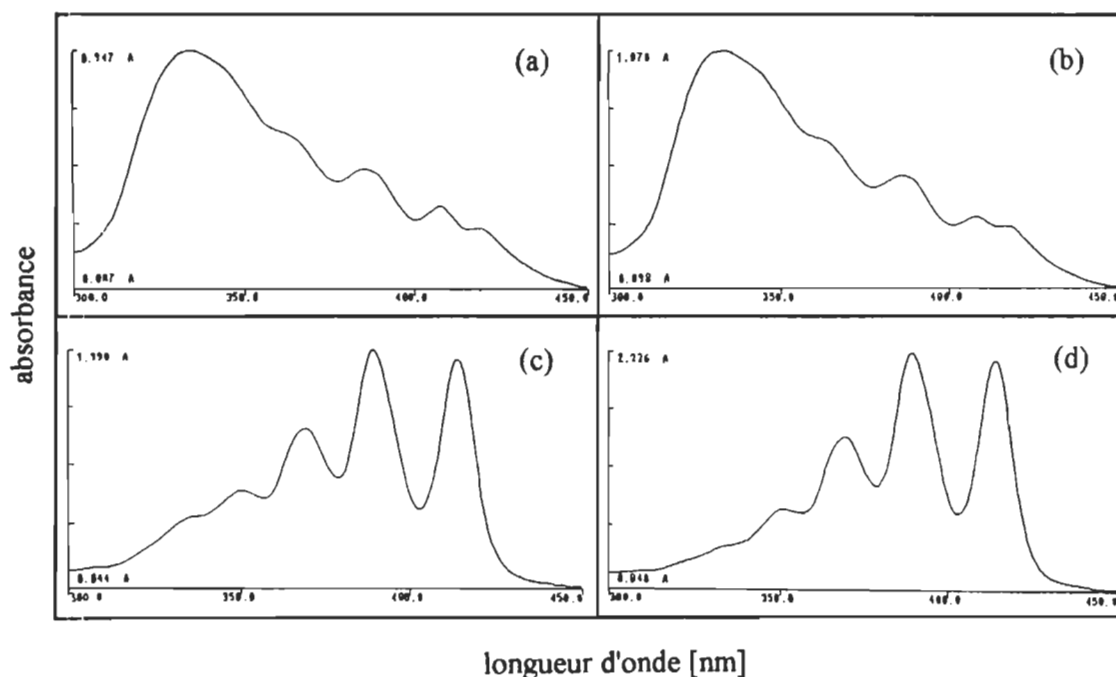


Figure 17. Spectres d'absorption électronique de solutions d'AmB ($2,5 \times 10^{-5}$ M) en présence de différentes concentrations de DOC: (a) $6,0 \times 10^{-6}$ M; (b) $1,0 \times 10^{-3}$ M; (c) $4,0 \times 10^{-3}$ M; (d) $7,0 \times 10^{-3}$ M

Nous avons choisi ces concentrations parce qu'elles correspondent aux régions caractéristiques de la courbe du signal de diffusion de la lumière en fonction du $\log[\text{DOC}]$ (Figure 16), c'est-à-dire avant la première augmentation

du signal, au maximum du signal, près du minimum du signal, et après la dernière augmentation du signal.

Le premier spectre (Figure 17-(a)) est typique pour le mélange d'agrégats-micelles et de monomères de l'AmB; il montre le pic à 409 nm correspondant à l'AmB-monomère, et deux bandes, une large aux alentours de 340 nm et l'autre près de 420 nm, caractéristique de l'AmB agrégée (voir Figure 4).

Le spectre correspondant à la région du signal maximal de la diffusion de la lumière (Figure 17-(b)), indique surtout que la bande près de 340 nm est devenue plus importante par rapport à la bande de l'AmB-monomère (voir Tableau 5), ce qui indique l'augmentation de concentration des oligomères, composants des agrégats-micelles de l'AmB (pour un rappel, voir le chapitre 4.1.3.1). Cet effet, observé en présence de concentration de plus en plus élevée du surfactant dans la solution, est probablement causé par le phénomène de la diminution de la solubilisation de la substance principale par l'ajout d'autre substance soluble à la solution et par l'affinité du DOC pour l'AmB. Donc, l'augmentation du signal de diffusion la lumière dans ces conditions dépend d'une part de l'augmentation des dimensions des micelles mixtes AmB-DOC et, d'autre part, de la concentration plus élevée de la forme agrégée de l'AmB dans le milieu. Dans le cas de cette solution, on parle de micelles mixtes composées des agrégats-micelles d'AmB et des monomères de DOC.

Tableau 5

Valeurs d'absorbance pour les bandes de spectres présentés sur la Figure 17

Absorbance	Figure 17(a)	Figure 17(b)	Figure 17(c)	Figure17(d)
à 340 nm	0,947	1,078	0,608	0,440
à 409 nm	0,379	0,372	-	-
à 413 nm	-	-	1,873	2,095

Le spectre de la solution en présence de DOC à $4,0 \times 10^{-3}$ M (Figure 17-(c)) montre que la structure des micelles mixtes est presque complètement détruite parce qu'on observe principalement les bandes de l'AmB-monomère (voir le Tableau 5).

Le dernier spectre (Figure 17-(d)), qui correspond à la nouvelle structure micellaire, est semblable au spectre précédent (voir le Tableau 5). Il montre le déplacement de la bande principale de 409 nm à 413 nm, provoqué par la présence d'un grand nombre de micelles de DOC dans l'environnement des monomères d'AmB. On peut dire que les monomères d'AmB dans ce cas sont solvatés par les molécules de DOC.

Les résultats des spectres pour les autres concentrations d'AmB, au dessus de sa CMC, ont été similaires à ceux décrits ci-haut. Évidemment, les spectres des mélanges d'AmB à la concentration $1,0 \times 10^{-7}$ M (en dessous de sa CMC), et une gamme des concentrations de DOC, représentent seulement l'AmB-monomère.

4.1.3.3 Effet du monolaurate de sucrose sur l'état d'agrégation de l'AmB

Dans des études parallèles avec le LS comme surfactant, les résultats ont été semblables.

Méthode de diffusion de la lumière

Pour la description de cette méthode voir l'Annexe B-(3).

La Figure 18 montre le changement du signal de diffusion de la lumière pour les quatre concentrations d'AmB en fonction de concentrations croissantes de LS.

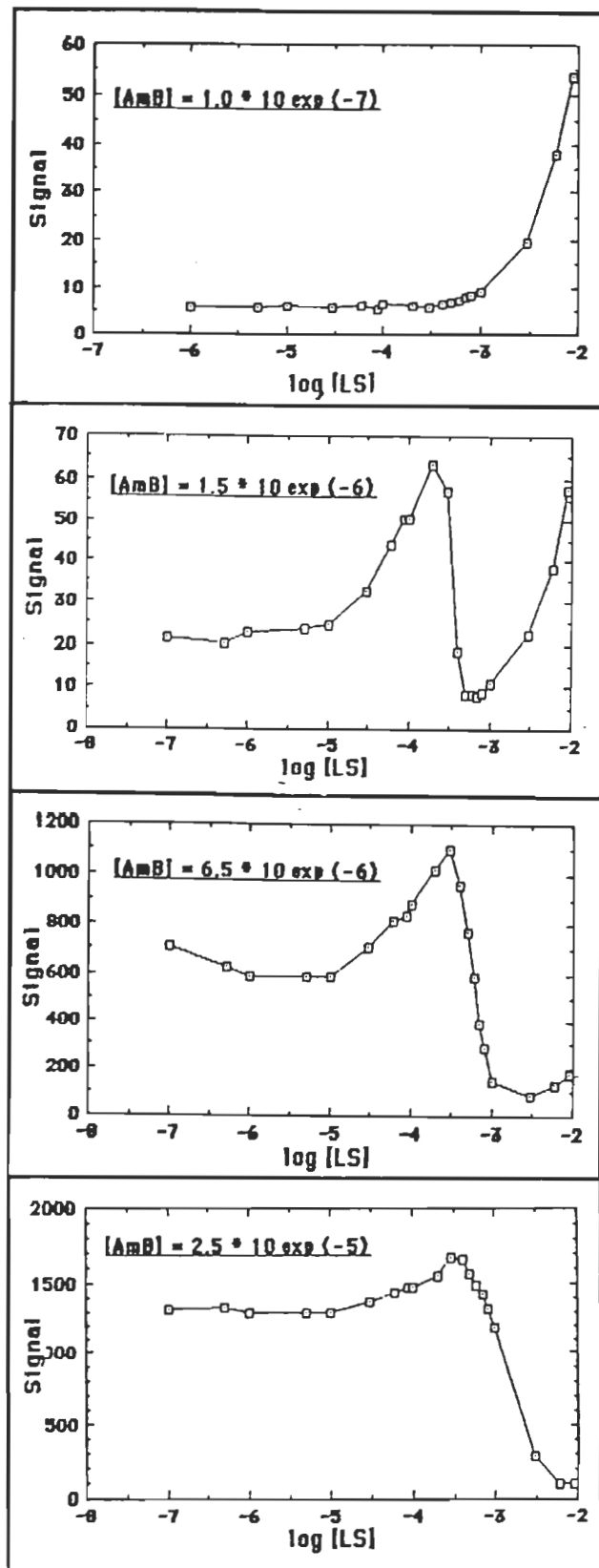


Figure 18. Effet du LS sur la diffusion de la lumière pour quatre concentrations d'AmB

On observe que la première augmentation du signal est beaucoup plus significative que dans le cas du DOC. Ainsi, dans la formation de micelles mixtes AmB-LS, le surfactant joue un rôle très important, provoquant une telle augmentation du signal de diffusion de la lumière. Quand la concentration d'antibiotique dans la solution augmente, cela provoque un déplacement de la CMC du LS vers des valeurs plus élevées, ce qui n'était pas observé dans le cas du DOC (Tableau 6).

Tableau 6
Valeurs des CMC pour le DOC et le LS en présence d'AmB

Système	CMC [M]
LS en présence de:	
1,0 × 10 ⁻⁷ M de l'AmB	5,8 × 10 ⁻⁴
1,5 × 10 ⁻⁶ M de l'AmB	5,9 × 10 ⁻⁴
6,5 × 10 ⁻⁶ M de l'AmB	1,4 × 10 ⁻³
2,5 × 10 ⁻⁵ M de l'AmB	6,3 × 10 ⁻³
DOC en présence de:	
1,0 × 10 ⁻⁷ M de l'AmB	4,5 × 10 ⁻³
1,5 × 10 ⁻⁶ M de l'AmB	4,5 × 10 ⁻³
6,5 × 10 ⁻⁶ M de l'AmB	4,5 × 10 ⁻³
2,5 × 10 ⁻⁵ M de l'AmB	4,5 × 10 ⁻³

D'après le caractère des courbes de diffusion de la lumière et des résultats montrés au Tableau 4 comparés avec ceux du Tableau 6, on peut suggérer que l'interaction surfactant-antibiotique pour le mélange LS-AmB est nettement plus grande que pour le cas DOC-AmB. Est-ce que cette différence est causée par la différence de la nature chimique des surfactants?

En comparant la variation du signal de diffusion de la lumière pour une solution aqueuse d'AmB de $6,5 \times 10^{-6}$ M en fonction de la concentration de DOC, de LS ou de Tween 80, un autre surfactant utilisé dans ce travail, on peut constater que la courbe de LS reste toujours celle pour laquelle l'effet sur la diffusion de lumière est le plus prononcé (Figure 19).

Le polyène seul à cette concentration ($6,5 \times 10^{-6}$ M) dans l'eau est sous forme agrégée. Dans tous les cas présentés, l'augmentation de la concentration de surfactant exerce un effet similaire sur le signal de diffusion de la lumière.

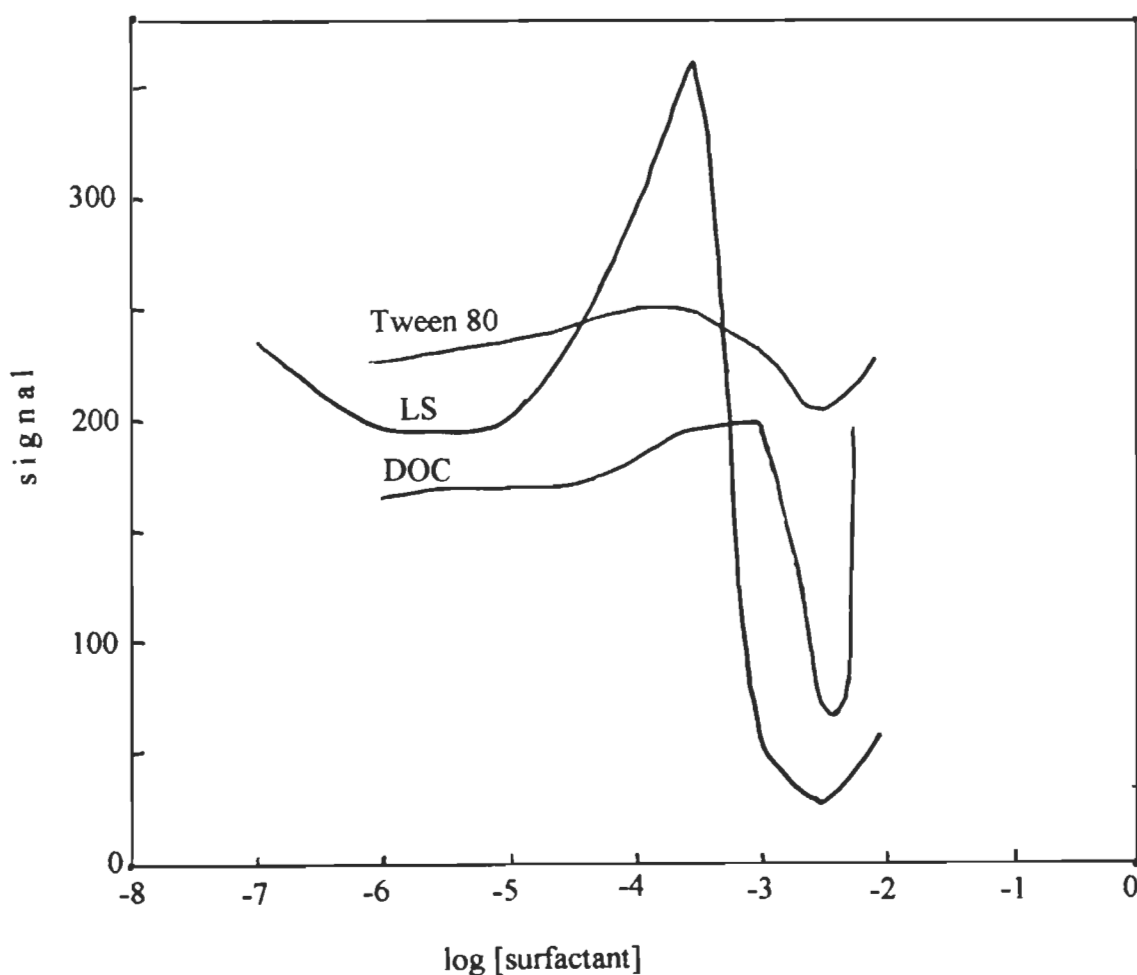


Figure 19. La variation du signal de diffusion de la lumière d'une solution d'AmB $6,5 \times 10^{-6}$ M en fonction de la concentration de LS, de DOC et de Tween 80

La Figure 19 montre que les surfactants à structure totalement différente ont un effet similaire sur les agrégats d'AmB dans la solution. Cet effet est très prononcé dans le cas du LS, moins prononcé pour le DOC et très faible dans le cas du Tween 80. Pour ce dernier, le signal de diffusion de la lumière pour les concentrations élevées de surfactant baisse très peu, indiquant ainsi que le Tween 80 n'est pas en mesure de briser complètement les agrégats-micelles de l'AmB.

Spectroscopie d'absorption UV-VIS et DC

Les spectres en UV-VIS et en DC (voir l'Annexe B-(1) et (2)) des polyènes sont très sensibles aux changements conformationnels provoqués par différentes interactions intermoléculaires incluant l'agrégation.

Une série de spectres d'absorption en UV-VIS et en DC a été faite pour les solutions aqueuses d'AmB de $6,5 \times 10^{-6}$ M en présence d'une large gamme des concentrations du surfactant LS, de $5,0 \times 10^{-6}$ M à $2,0 \times 10^{-4}$ M. (Figure 20). La partie marquée de la courbe du signal de diffusion de la lumière pour les mêmes conditions que les spectres est présentée dans le petit encadré dans le coin supérieur droit de la Figure 20-(a).

Les changements du spectre qui correspondent à l'augmentation de la valeur du signal de diffusion de la lumière jusqu'au maximum consistent en l'abaissement de la valeur d'absorbance de la bande caractéristique du monomère et en l'augmentation de la valeur d'absorbance de la large bande caractéristique de l'AmB agrégée. On ne remarque pas d'apparition de nouvelles bandes, ce qui aurait pu suggérer la présence d'une nouvelle forme agrégée de l'AmB. Le même phénomène se manifeste sur les spectres de DC.

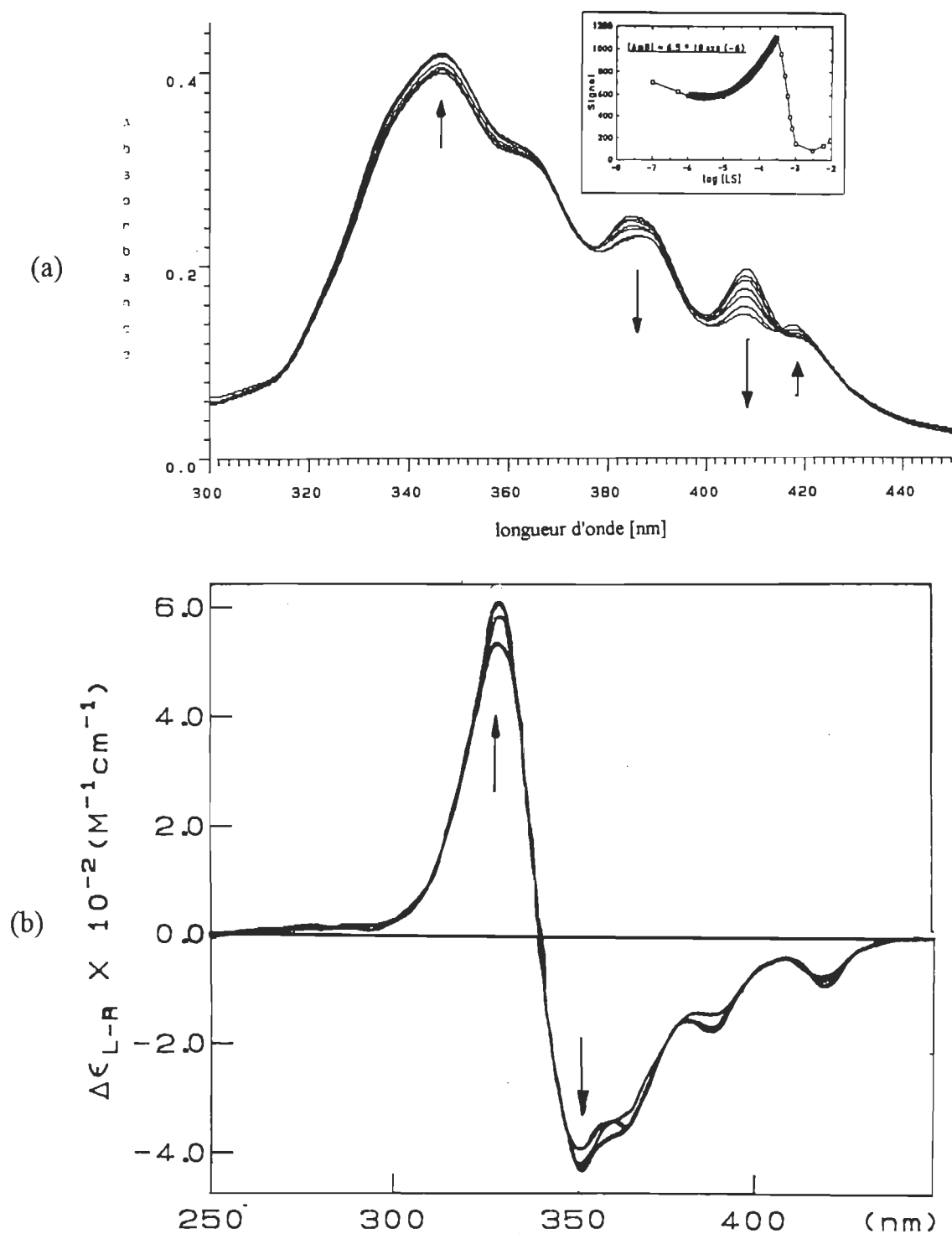


Figure 20. Spectres de l'AmB $6,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ en présence de concentrations de LS de $5,0 \times 10^{-6} \text{ M}$ à $2,0 \times 10^{-4} \text{ M}$. Les spectres UV-VIS (a), de DC (b). Les flèches indiquent le sens de changement du spectre avec la concentration croissante du LS

Le doublet dichroïque caractéristique de l'agrégat d'AmB passe par le niveau "0" toujours à la longueur d'onde de 347 nm, ce qui correspond très bien aux résultats obtenus en UV-VIS, c'est-à-dire que la bande au maximum à 347 nm sur le spectre d'absorption UV-VIS et que le doublet dichroïque représentent la même forme agrégée de l'AmB.

Les spectres enregistrés pour la gamme des concentrations de LS de $2,0 \times 10^{-4}$ M à $4,0 \times 10^{-3}$ M et pour la même concentration d'AmB ($6,5 \times 10^{-6}$ M) dans la solution aqueuse sont présentés sur la Figure 21.

Les spectres présentés sur la Figure 21 montrent clairement la destruction successive des micelles mixtes formées des agrégats-micelles de l'AmB et des monomères du LS jusqu'à la monomérisation totale de l'AmB. Le spectre de la forme agrégée disparaît et celui du monomère apparaît. Les flèches indiquent le sens des changements du spectre UV-VIS et de DC. La monomérisation de l'AmB commence avec le début de la destruction des micelles mixtes et continue jusqu'au moment où la concentration du surfactant dépasse sa CMC ($1,4 \times 10^{-3}$ M).

L'existence du point isobestique indique :

- le nombre constant des espèces dans la solution,
- l'équilibre entre ces espèces,
- le changement de l'équilibre en fonction de la concentration de surfactant.

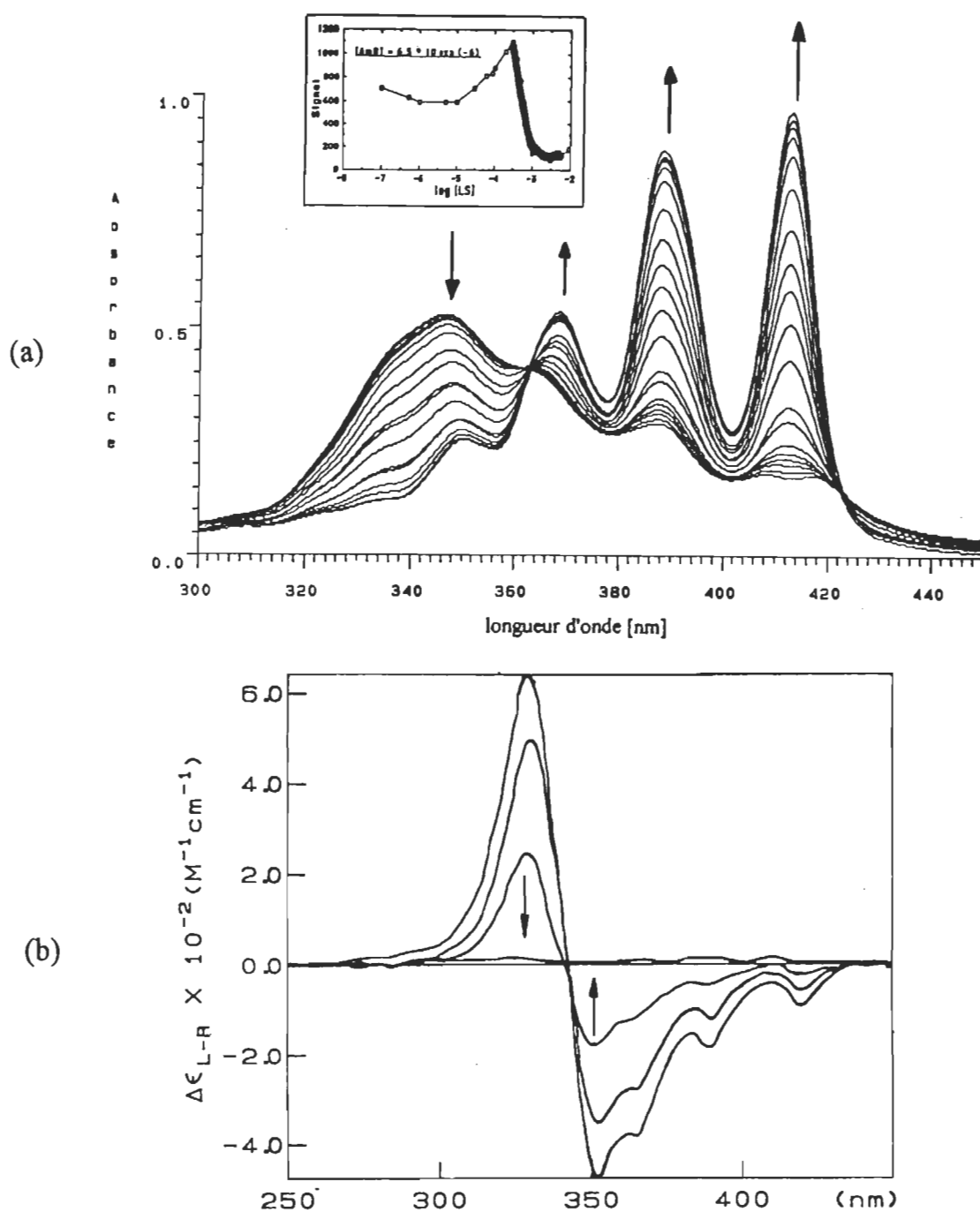


Figure 21. Spectres de l'AmB $6,5 \times 10^{-6}$ M en présence des concentrations du LS de $2,0 \times 10^{-4}$ M à $4,0 \times 10^{-3}$ M. Les spectres en UV-VIS (a); en DC (b). Les flèches indiquent le sens de changements du spectre pour des concentrations croissantes de LS. Dans l'encadré, la partie marquée de la courbe indique les changements du signal de diffusion de la lumière pour les mêmes conditions

Rapport d'absorbances $A_{409} : A_{347}$ (R)

Les modifications spectrales produites par l'agrégation peuvent être représentées par le rapport d'absorbances $R = A_{409} : A_{347}$, où A_{409} et A_{347} indiquent la valeur d'absorbance à 409 nm et à 347 nm respectivement (Gruda *et al.* 1988b). La valeur de ce rapport est près de 3,5 pour le spectre de la forme monomérique et il baisse jusqu'à 0,2 pour la forme agrégée. Ainsi, l'état d'agrégation peut être facilement mesuré par ce rapport. La Figure 22 montre que, en fonction du logarithme de la concentration du surfactant, le caractère de trois courbes, dont la première correspond au signal de diffusion de la lumière, la deuxième à la grandeur du doublet dichroïque et la troisième à l'inverse du rapport d'absorbances $1 : R$, est semblable. Donc, il est très probable que ces résultats expérimentaux reflètent le même phénomène.

La présence et le manque de déplacement de la bande à 347 nm signifient que les agrégats-micelles de l'AmB sont formés principalement d'une forme agrégée, c'est-à-dire d'un oligomère qui est caractéristique de la bande à 347 nm sur le spectre UV-VIS (ce qui a été déjà mentionné dans le cas de DOC).

Existe-t-il seulement une sorte d'oligomères pour l'AmB?

Probablement non. En se rappelant les traits caractéristiques de la molécule d'AmB, l'existence et le type d'oligomère de ce polyène devraient être influencés surtout par le milieu et par la présence des autres composés dans la solution. Du point de vue de l'administration thérapeutique de l'AmB par voie intraveineuse, le milieu aqueux devrait être exploré en première ligne et c'est pour cette raison que notre étude sur l'AmB a été effectuée avec l'eau.

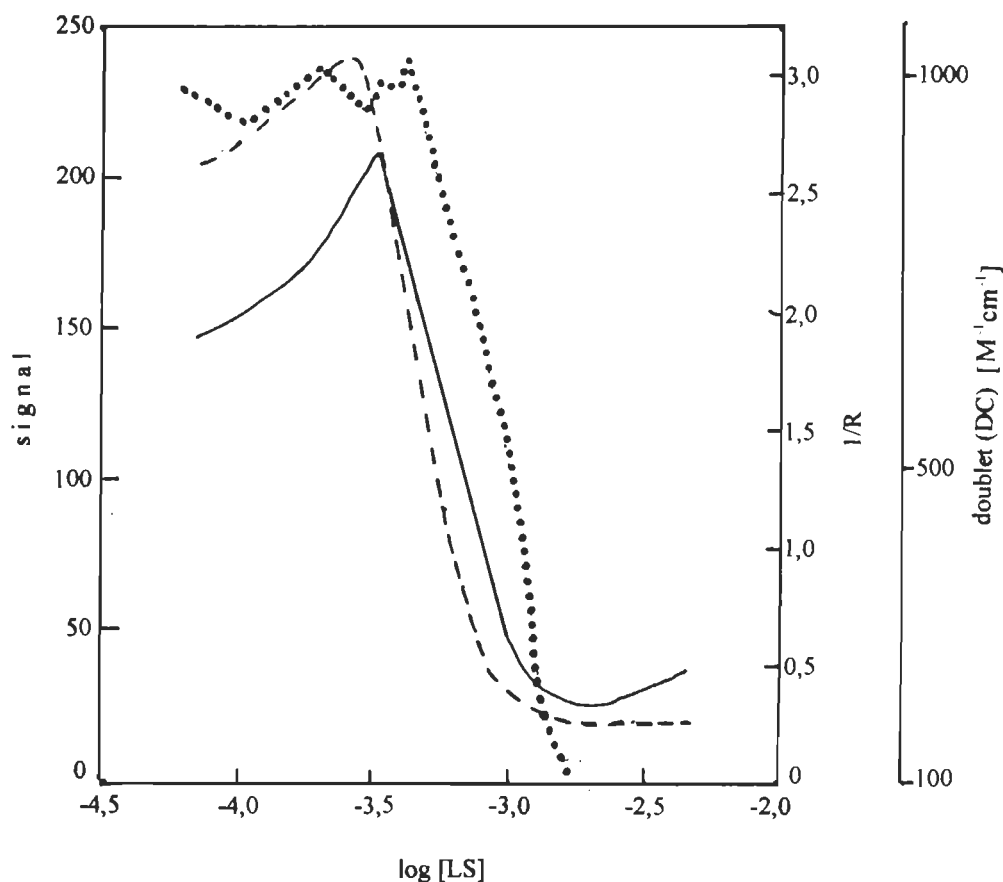


Figure 22. Effet du LS sur le signal de diffusion de la lumière (—), sur le rapport d'absorbances R (où $R = A_{409} : A_{347}$) (---) et sur la valeur du doublet dichroïque (····), de la solution aqueuse d'AmB $6,5 \times 10^{-6} \text{ M}$

L'analyse attentive des spectres présentés à la Figure 20-(a) et à la Figure 21(a) permet d'apercevoir que la large bande caractéristique de l'AmB agrégée a deux composantes, une principale à 347 nm et la deuxième, très faible, près à 328 nm. La bande à 328 nm devient la bande principale sur les spectres des solutions aqueuses de la Fungizone et de l'AmB en présence du surfactant Hegamec. Elle est également très prononcée sur le spectre de l'AmB en présence de 8% de propanol. Cela nous indique que deux types d'oligomères sont présents dans les solutions étudiées. L'autre bande faible qui apparaît à la longueur d'onde de 421 nm sur le spectre de l'AmB seule dans la solution ou sur le spectre de

l'AmB mélangée avec le LS aux concentrations en-dessous de la CMC, correspond à une autre sorte d'agrégation. La bande à 421 nm n'existe pas sur les spectres de l'AmB aux concentrations en dessous de 10^{-6} M (voir Figure 4-a), mais elle est séparée et bien visible sur les spectres de l'AmB aux concentrations plus élevées que 10^{-5} M dans l'eau (Figure 23).

L'analyse détaillée des oligomères d'AmB en milieu aqueux, ainsi que le modèle de leurs structures, ont été présentés dans le chapitre 4.4 .

À cause de la destruction des micelles mixtes AmB-LS, il y a, dans la solution finale, des micelles et des monomères du surfactant ainsi que des monomères de l'AmB.

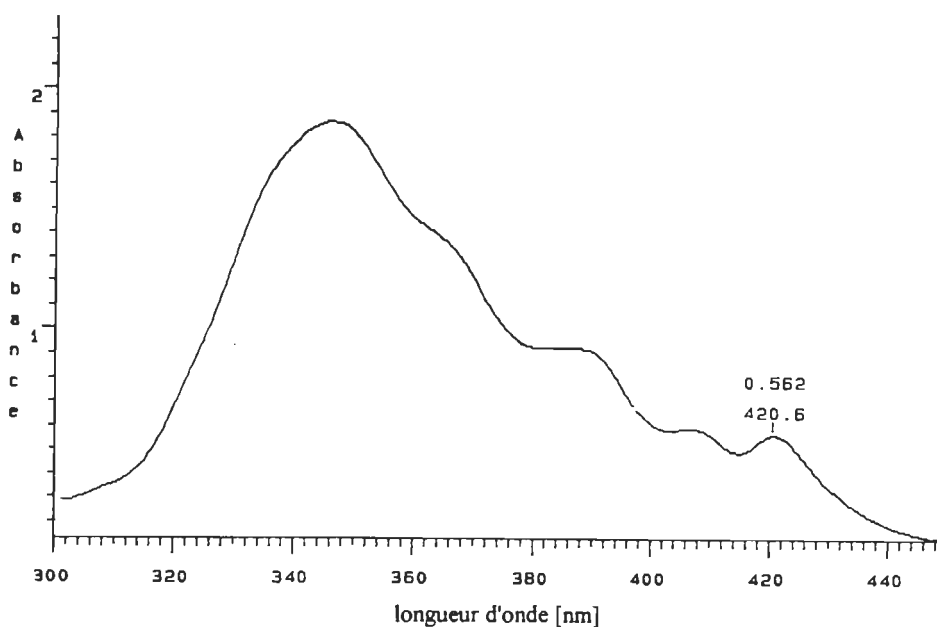


Figure 23. Spectre UV-VIS de solution aqueuse d'AmB $2,5 \times 10^{-5}$ M

Sachant que, à la concentration de $6,5 \times 10^{-6}$ M, l'AmB dans l'eau est principalement agrégée, on peut se poser la question suivante : quel genre de protection est fourni par les molécules de LS au polyène pour qu'il existe sous

forme des monomères? Sur la base des résultats présentés, il est difficile de préciser la localisation des molécules d'AmB quand les micelles de surfactant commencent à se former. Est-ce que l'AmB est présente sous forme de monomères en solution, ou est-elle présente sous forme de monomères dans les micelles du surfactant en formant de cette façon un nouveau type de micelles mixtes? Le fait que les spectres d'absorption électronique des solutions, où les micelles mixtes sont presque complètement détruites, soient similaires à ceux dans lesquelles les micelles du surfactant se forment, suggère que l'environnement des molécules d'AmB est identique dans ces deux cas.

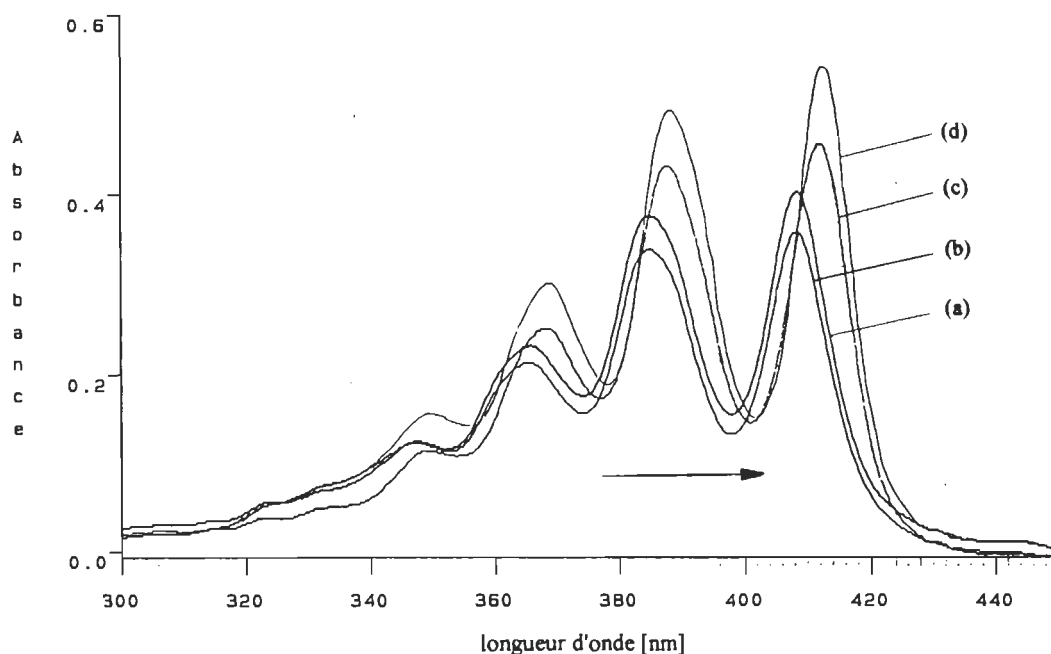


Figure 24. Spectres en UV-VIS de l'AmB seule à la concentration de $4,0 \times 10^{-7}$ M (en-dessous de sa CMC) et en présence des concentrations suivantes de LS : (a) sans LS; (b) $1,0 \times 10^{-5}$ M; (c) $5,0 \times 10^{-4}$ M; (d) $1,0 \times 10^{-2}$ M

Les spectres UV-VIS de la Figure 21-(a) et ceux présentés sur la Figure 24 indiquent nettement l'affinité du surfactant pour l'AmB. Le spectre de l'AmB monomérique est entièrement déplacé de 4 nm vers les longueurs d'onde plus élevées, par exemple de 409 nm à 413 nm. On peut donc dire que le polyène n'est plus dans le milieu aqueux mais dans le milieu des molécules de surfactant qui, à leur tour, se trouvent dans l'eau.

À la base des résultats des spectres il n'est pas possible de juger si l'AmB est liée aux micelles du surfactant ou si elle est solvatée par les monomères de LS restant dans la solution.

Nous avons donc utilisé la méthode d'ultracentrifugation et la méthode de chromatographie d'exclusion par la taille pour répondre à cette question.

Méthode d'ultracentrifugation

La méthode d'ultracentrifugation (voir Annexe B-(5)) des solutions d'AmB de $6,5 \times 10^{-6}$ M avec quatre concentrations de LS: $1,0 \times 10^{-5}$ M; $3,0 \times 10^{-4}$ M; $4,0 \times 10^{-3}$ M; $8,0 \times 10^{-3}$ M, n'a pas permis la séparation totale des micelles mixtes composées des agrégats-micelles de l'AmB et des monomères de LS, ni la séparation des micelles du surfactant.

Pour les deux premières solutions où la valeur du signal de diffusion de la lumière se situe immédiatement avant la première montée et au maximum du signal (Figure 18), l'ultracentrifugation n'a pas permis de séparer complètement les micelles mixtes. Le spectre UV-VIS du surnageant montre l'AmB-monomère avec la bande principale à 409 nm, mais avec une valeur du rapport d'absorbances R (où $R = A_{409} : A_{347}$) de 1,37, donc loin de la valeur de R pour la

monomérisation totale. Le culot jaune n'était pas soluble dans l'eau, il a été dissout dans le diméthyle sulphoxyde (DMSO).

L'ultracentrifugation de la troisième solution à la concentration de LS de $4,0 \times 10^{-3}$ M, donc au minimum de la valeur du signal de diffusion de la lumière, n'a donné aucune sédimentation. Le spectre de l'AmB de la solution centrifugée correspond au polyène monomérique avec une bande principale à 413 nm.

L'ultracentrifugation de la dernière solution du LS ($8,0 \times 10^{-3}$ M) a donné le culot blanc facile à solubiliser dans l'eau. Il était probablement composé des micelles de LS. Les spectres du culot et du surnageant représentent l'AmB sous forme monomérique avec une bande principale à 413 nm. La valeur du signal de diffusion de la lumière du surnageant étant loin du minimum, on peut conclure que la séparation des micelles du surfactant n'est pas totale.

Les résultats obtenus d'après l'ultracentrifugation renforcent l'hypothèse que l'état d'agrégation de l'AmB dépend de la concentration de LS et qu'il existe une affinité du surfactant pour ce polyène permettant de le stabiliser dans la forme monomérique probablement par l'insertion dans des micelles.

Méthode de la chromatographie d'exclusion par la taille

La méthode de la chromatographie d'exclusion par la taille (voir Annexe B-(4)) a permis de trouver une réponse plus claire aux questions posées. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 25.

La solution aqueuse étudiée contenait l'AmB à une concentration de $6,5 \times 10^{-6}$ M et le LS à une concentration de 5×10^{-2} M (au-dessus de sa CMC). Une concentration très élevée de LS a été choisie pour que la solution après la dilution probable sur la colonne contienne toujours le surfactant micellaire et l'AmB monomérique dans l'environnement de surfactant avec la bande principale

de son spectre à 413 nm. Les deux histogrammes, l'un indiquant les changements du signal de diffusion de la lumière des extraits de la colonne et l'autre représentant la valeur de l'absorbance à 413 nm des spectres en UV-VIS de ces extraits, se superposent presque parfaitement. Les échantillons sortis de la colonne contiennent les micelles de LS qui se caractérisent par la valeur élevée du signal de diffusion de la lumière, les mêmes échantillons contiennent l'AmB monomérique avec la bande principale à 413 nm sur le spectre.

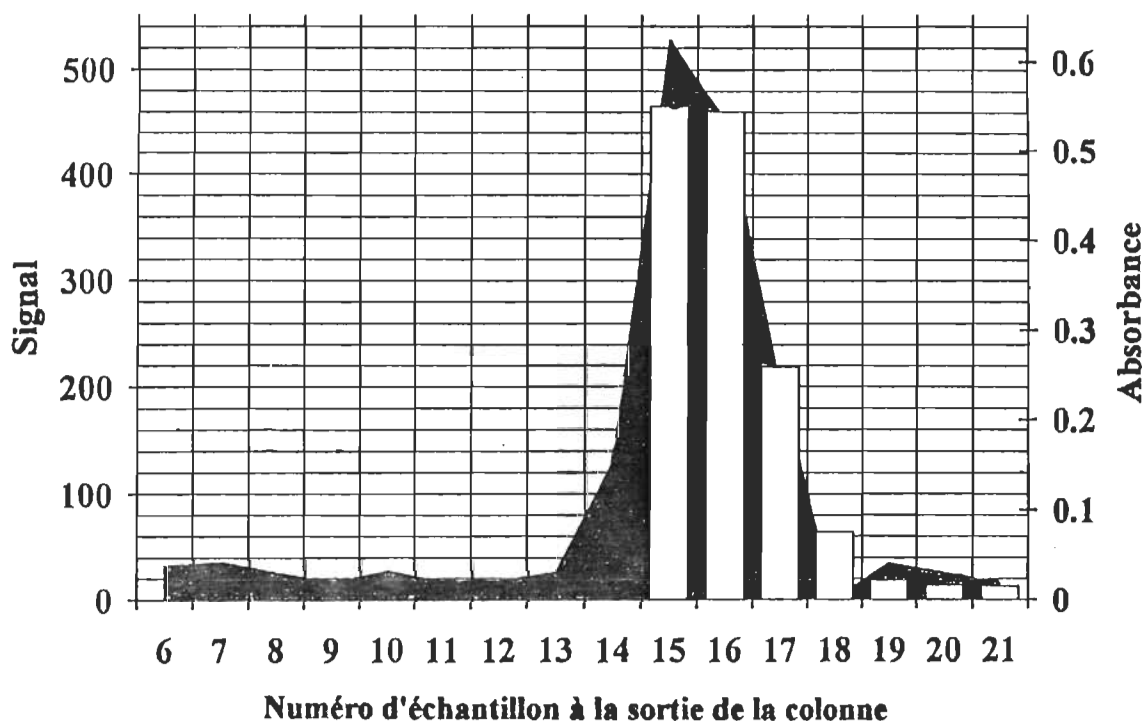


Figure 25. Résultats de chromatographie d'exclusion par la taille pour le mélange de $6,5 \times 10^{-6}$ M d'AmB et de 5×10^{-2} M de LS. La valeur du signal de diffusion de lumière (■); la valeur d'absorbance à 413 nm (□)

Ces résultats prouvent clairement que l'AmB monomérique est liée aux micelles du surfactant.

Comme il a été mentionné, la spectroscopie optique d'absorption UV-VIS et en DC montre les spectres des oligomères et des monomères d'AmB. Il est aussi intéressant de savoir quelle est la grandeur des agrégats-micelles de l'AmB, des micelles mixtes AmB-LS et des micelles de LS.

Méthode de diffusion quasi élastique de la lumière

La méthode de diffusion quasi élastique de la lumière (voir l'Annexe B-(6)) a permis de réaliser des mesures mentionnées ci-haut. Les résultats de cette étude se trouvent sur la Figure 26.

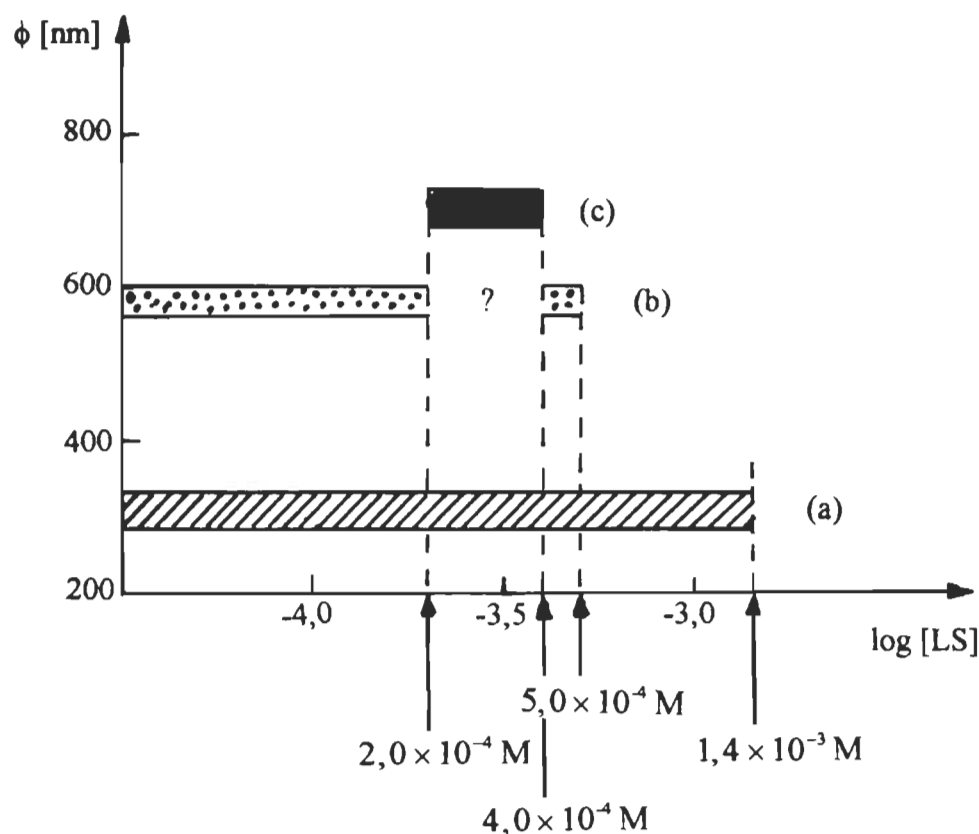


Figure 26. Diamètre des formes présentes dans la solution d'AmB $6,5 \times 10^{-6} \text{ M}$ en fonction de concentrations croissantes de LS

La grandeur des formes présentes dans la solution aqueuse de l'AmB à $6,5 \times 10^{-6}$ M est caractérisée par leur diamètre en nanomètre en supposant que toutes ces formes soient sphériques. L'existence de ces formes est démontrée en fonction de la concentration de LS.

Les formes de 305 ± 25 nm (a) et de 580 ± 20 nm (b) de diamètre se trouvent dans la solution avant que le LS soit ajouté. Avec la concentration croissante du surfactant dans le milieu, on n'observe aucun changement jusqu'à la valeur de $2,0 \times 10^{-4}$ M quand la forme de diamètre de 705 ± 25 nm (c) se manifeste. Cette grandeur est observée jusqu'à une concentration de LS de $4,0 \times 10^{-4}$ M. Quand la forme (c) est présente en solution, l'autocorrélateur ne détecte pas de forme plus petite (la région de point d'interrogation sur la Figure 26). Ce fait suggère que la forme (b) n'existe pas dans ces conditions ou qu'elle n'est pas en assez grand nombre par rapport à celle de plus grand diamètre, et l'appareil n'est pas en mesure de l'enregistrer. Au moment où la plus grande forme (c) disparaît, l'appareil continue d'apercevoir la forme (b) jusqu'à la concentration près de $5,0 \times 10^{-4}$ M du surfactant à laquelle seule la forme (a) reste dans la solution. Cette forme disparaît à son tour avec l'augmentation de concentration de LS, à $1,4 \times 10^{-3}$ M de LS.

En comparant les résultats ci-dessus avec ceux de la Figure 22, on constate que la forme (c) se manifeste dans la région du maximum du signal de diffusion de la lumière et dans la région du plus grand état d'agrégation de l'AmB. Donc, la forme (c) caractérise les micelles mixtes AmB-LS composées d'agrégats-micelles de l'AmB et de monomères de LS.

L'ensemble des résultats indiqués sur les figures 20, 21 et 26 suggère une corrélation entre les formes de 580 ± 20 nm de diamètre et la bande d'absorption

à 421 nm, et ensuite une corrélation entre les formes de 305 ± 25 nm de diamètre et la bande à 347 nm.

4.1.4 Effet du surfactant sur l'interaction de l'amphotéricine B avec le cholestérol et l'ergostérol

Il est connu que les changements des spectres d'absorption en UV-VIS reflètent aussi bien l'interaction de l'AmB avec les stérols que l'état d'agrégation de l'AmB seule (voir le chapitre 2.2.1.1). Il a été mentionné aussi que l'augmentation de la concentration de surfactants non ioniques, tels les esters de sucrose, affecte les liens AmB-stérols (Gruda *et al.* 1988b; Brajtburg *et al.* 1989). Il a été démontré que des concentrations bien définies d'esters de sucrose ont provoqué une augmentation de la sélectivité de l'AmB pour les stérols (Gruda *et al.* 1991). On utilise le rapport d'absorbance (R) de la bande à la plus grande longueur d'onde sur celle près de 347 nm, comme mesure de l'état d'agrégation de l'AmB (dans les expériences sans stérols), ou de lien de l'antibiotique avec les stérols (Gruda *et al.* 1988b).

D'après les études de l'effet du DOC sur le lien AmB-stérol par absorption électronique, il est possible de déterminer la variation du rapport R en fonction de différentes concentrations de DOC pour l'AmB seule (Figure 27, courbe A), et en présence d'une quantité équimolaire de cholestérol (Figure 27, courbe B), ou d'ergostérol (Figure 27, courbe C).

La concentration d'AmB choisie pour cette expérience est de $6,5 \times 10^{-6}$ M, soit au dessus de sa CMC.

La Figure 27 montre que, jusqu'à un rapport molaire DOC : AmB de 300, on n'observe pas d'influence du surfactant sur R, ni dans le cas où l'AmB est seule, ni dans le cas où l'AmB est en présence du stérol. Aux concentrations plus grandes de DOC, la valeur de R pour l'AmB seule (courbe A) augmente et atteint un plateau à un rapport R de 3,5. Dans ce cas, le rapport molaire DOC : AmB est de 600, et la concentration du DOC correspond exactement à sa CMC.

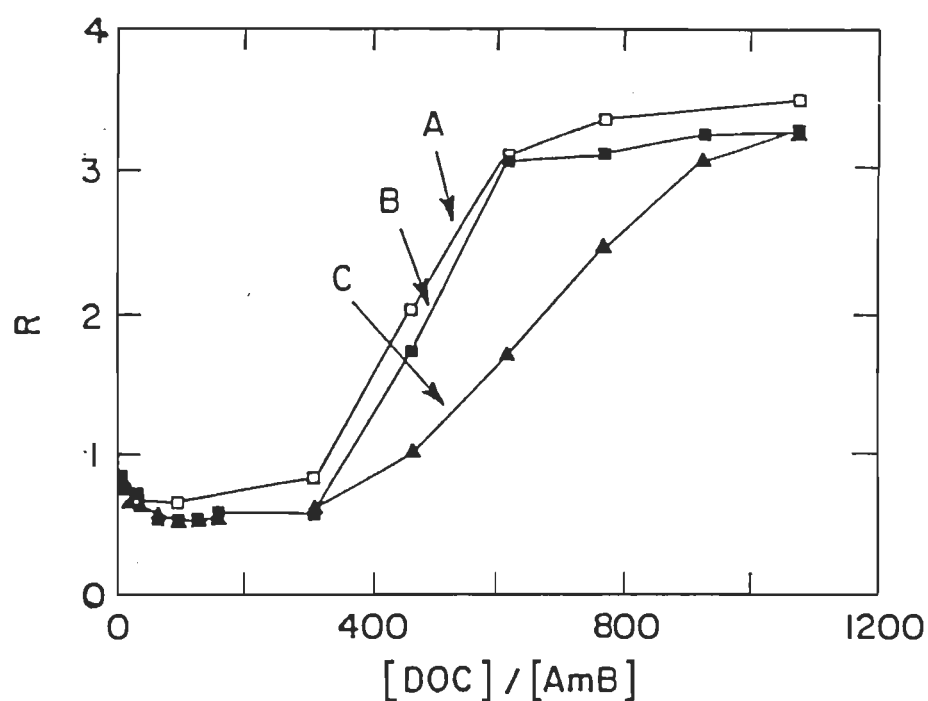


Figure 27. Effet du DOC sur le rapport d'absorbances R ($R = A_{409} : A_{347}$) de solutions d'AmB dans le propanol 6,5 %. La concentration d'AmB est de $6,5 \times 10^{-6}$ M. Sans stérol (A); avec $6,5 \times 10^{-6}$ M de cholestérol (B); avec $6,5 \times 10^{-6}$ M d'ergostérol (C)

L'addition d'une quantité équimolaire de cholestérol (courbe B), provoque seulement une petite diminution de R par rapport à la courbe A, ce qui veut dire que, dans cette région de concentrations de DOC, le lien AmB-cholestérol est

inhibé. L'addition de l'ergostérol abaisse nettement la valeur de R , indiquant qu'à la même concentration du surfactant le lien AmB-ergostérol est beaucoup moins inhibé que le lien AmB-cholestérol.

Cette sélectivité influencée par la présence du DOC peut être mesurée par $\Delta R = R_{\text{chol}} - R_{\text{erg}}$. La Figure 28 montre ΔR en fonction du rapport molaire DOC : AmB.

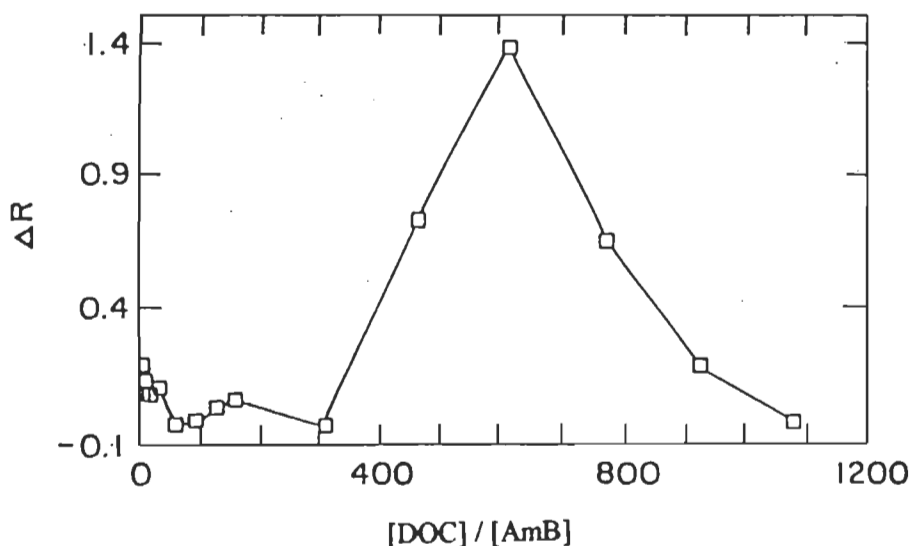


Figure 28. Sélectivité d'interaction AmB-stérols en présence du DOC
($\Delta R = R_{\text{chol}} - R_{\text{erg}}$)

On peut voir clairement l'existence d'une sélectivité maximale pour une valeur du rapport molaire DOC : AmB de 600, ce qui correspond à la CMC du DOC et au moment où l'antibiotique est presque totalement sous la forme de monomère. Pour le rapport molaire DOC : AmB de 1 000, on n'observe aucune formation de liens entre l'AmB et les stérols.

Sachant que :

- la valeur de la CMC du DOC est de $4,5 \times 10^{-3}$ M;
- celle-ci n'est pas influencée par l'augmentation de la concentration de l'AmB dans la solution;

- la concentration maximale de la solution thérapeutique de Fungizone est de 10^{-4} M;
- le rapport molaire DOC : AmB dans la Fungizone est égale de 2;

on peut conclure que :

- la concentration de DOC dans la solution thérapeutique est loin de la valeur de sa CMC, ce qui signifie que l'AmB est sous forme agrégée dans cette solution;
- le rapport molaire DOC : AmB dans la solution thérapeutique est 20 fois plus petit que celui de la région de la plus grande sélectivité.

L'effet de l'augmentation de la sélectivité de l'AmB en présence du DOC est identique à celui causé par les esters de sucrose (Gruda *et al.* 1991). La seule différence est la concentration de surfactant qui exerce un effet sur la sélectivité de l'antibiotique.

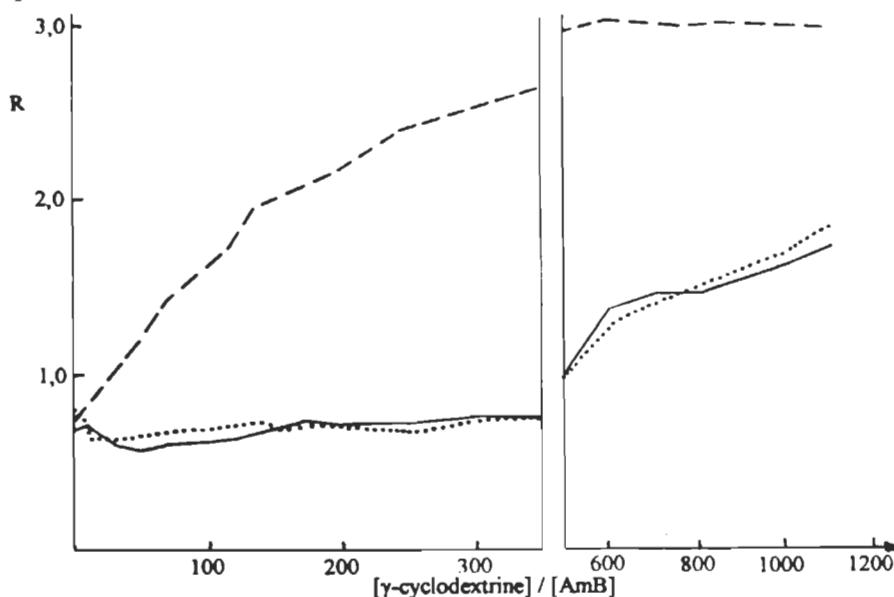


Figure 29. Effet de la γ -cyclodextrine sur le rapport d'absorbances R ($R = A_{409} : A_{347}$) de solutions d'AmB dans le propanol 6,5 %. La concentration d'AmB est de $6,5 \times 10^{-6}$ M. Sans stérol (---); avec $6,5 \times 10^{-6}$ M de cholestérol (....); avec $6,5 \times 10^{-6}$ M d'ergostérol (—)

Nous avons étudié un autre composé, la γ -cyclodextrine, qui n'est pas un surfactant mais qui forme un complexe avec l'AmB pour la rendre soluble dans l'eau (Kajtar *et al.* 1989), du point de vue de son effet sur l'activité sélective de l'AmB envers les stérols. Les résultats de cette étude sont surprenants (Figure 29). Premièrement, la γ -cyclodextrine ne monomérise pas totalement l'AmB (la valeur du rapport d'absorbances R ne dépasse pas 3). Deuxièmement, dans les solutions d'AmB $6,5 \times 10^{-6}$ M contenant des quantités équimolaires de cholestérol ou d'ergostérol en présence de γ -cyclodextrine, on n'observe aucune sélectivité de l'AmB par rapport à ces deux stérols.

4.1.5 Discussion

Comme il a été déjà mentionné, l'activité anticellulaire de l'AmB se manifeste respectivement par le changement de la perméabilité de la membrane cellulaire jusqu'à la lyse du contenu de la cellule, l'inhibition de la croissance et la mort des cellules. Les cellules fongiques sont plus sensibles à l'action de l'AmB que les cellules animales, mais cette sélectivité n'est pas assez grande, ce qui fait de l'AmB un médicament relativement toxique.

Pour améliorer les propriétés de ce médicament, il faut augmenter sa solubilité, abaisser sa toxicité, augmenter la sélectivité déjà existante en favorisant l'état moléculaire optimal de l'antibiotique et l'introduire un système de protection qui servira à inhiber l'interaction de l'AmB avec les composants des cellules de mammifères et avec les composants du sang, milieu de transport de l'AmB dans l'organisme.

L'inhibition de l'interaction de l'AmB avec :

- le cholestérol, un des composants de la membrane cellulaire animale,

- les phospholipides,
- les lipoprotéines plasmatiques qui contiennent le cholestérol ou ses dérivés,
- le sérum ,

peut être réalisée par l'incorporation de l'AmB dans des liposomes, la complexation avec des lipides, la dispersion dans une émulsion ou l'enrobage par les molécules d'un surfactant.

Dans le traitement des mycoses systémiques l'augmentation de la dose d'AmB administrée est très souhaitable, mais impossible à réaliser à cause de l'apparition d'effets secondaires très graves. L'amélioration de la solubilité de l'AmB dans l'eau obtenue par le mélange avec un surfactant, le DOC, a donné des résultats positifs en abaissant un peu la toxicité de l'antibiotique. Aussi, de nombreuses études ont montré que les surfactants peuvent moduler l'activité du médicament. Cette modulation peut résulter du changement de la solubilité du médicament, de son absorption, de sa distribution ou des liens formés avec les composants de la cellule (Attwood *et al.* 1983).

L'hypothèse selon laquelle l'état d'agrégation de l'AmB peut être responsable de sa toxicité sélective (Gruda *et al.* 1988a) a été confirmée par une série d'études dont les résultats ont montré que l'état d'agrégation de l'AmB affecte la sélectivité cholestérol-ergostérol *in vitro*, aussi bien que la sélectivité cellule fongique-cellule animale (Gruda *et al.* 1991). La concentration de LS nécessaire pour inhiber l'effet antifongique de la Fungizone est 1 000 fois plus grande que la concentration qui inhibe sa toxicité envers les cellules mammifères (Brajtburg *et al.* 1989; Gruda *et al.* 1988b). L'effet de l'état d'agrégation sur la sélectivité de l'AmB a été aussi observé par le groupe travaillant avec les modèles membranaires (Bolard *et al.* 1991). Les auteurs démontrent que l'AmB doit être

sous forme autoassociée (agrégée) pour affecter la perméabilité des liposomes contenant du cholestérol aux ions K^+ , et que les deux formes de l'antibiotique, monomérique et agrégée, stimule la fuite des ions K^+ des modèles membranaires contenant de l'ergostérol. Pour cette raison, ils déduisent que, dans le but de réduire la toxicité du médicament, chaque modification de la formulation de l'AmB devrait viser à abaisser l'autoassociation des molécules de l'antibiotique dans l'eau.

Pour mieux comprendre la base moléculaire du mécanisme d'action de l'AmB, nous avons étudié l'effet de quelques surfactants sur l'état physique de l'AmB et sur la sélectivité cholestérol-ergostérol *in vitro*. Nous avons mis en évidence que :

- l'addition de différents surfactants exerce des effets semblables sur les agrégats-micelles d'AmB;
- des micelles mixtes se forment par pénétration des molécules de surfactant dans les agrégats-micelles de l'antibiotique;
- en cas de concentration plus élevée de surfactant, la structure agrégée est détruite complètement et les monomères d'AmB apparaissent dans la solution;
- pour des concentrations variables d'AmB, la valeur de CMC de DOC reste constante, mais celle de LS est modifiée en présence d'AmB;
- les surfactants influencent l'interaction sélective de l'AmB envers les stérols exactement aux concentrations des surfactants qui provoquent la monomérisation de l'antibiotique;
- la sélectivité maximale se trouve aux concentrations de surfactants qui correspondent à leur CMC en présence d'AmB;

- le rapport molaire DOC : AmB dans la solution thérapeutique est 20 fois plus petit que celui de la région de la plus grande sélectivité de l'antibiotique.

Le comportement du mélange AmB-surfactant observé dans le milieu aqueux est en accord avec le modèle thermodynamique des changements effectués par les surfactants dans l'eau (Desnoyers J.E.,1989). D'après cette approche, dans le système surfactant-eau, la plus importante contribution à l'énergie libre du système est la différence entre l'énergie libre de la chaîne aliphatique (partie hydrophobe) de la molécule de surfactant dans la solution aqueuse et l'énergie libre de cette partie dans l'agrégat-micelle.

Dans le système de trois composants, par exemple AmB-surfactant-eau, les principaux effets qui permettent la formation des micelles mixtes, sont les suivants :

- l'interaction entre les monomères du soluté et du surfactant dans la région prémicellaire;
- la distribution du soluté entre la phase aqueuse et les micelles ;
- les changements de l'équilibre micellaire provoqués par la présence du soluté;
- les interactions entre les molécules du soluté et du surfactant dans les micelles mixtes;
- les changements de la grandeur et souvent de la forme des micelles, induits par le soluté.

Ces effets caractérisent très bien deux phénomènes observés dans nos études, c'est-à-dire la formation des micelles mixtes des agrégats-micelles d'AmB avec des monomères de surfactant, où l'antibiotique joue un rôle de surfactant et le surfactant examiné joue un rôle de soluté, et la formation des micelles mixtes

des micelles de surfactant avec des monomères d'AmB qui, cette fois, joue un rôle de soluté.

Il est maintenant évident (Aoudia *et al.* 1991) que, au moment de la CMC, on n'est pas en présence de la situation suivante :

$$n \cdot M = M_n \quad \text{où } M = \text{monomère, } M_n = \text{micelle}$$

mais plutôt :

$$M_{n-1} + M = M_n \quad \text{où } M_{n-1} = \text{forme prémicellaire}$$

La courbe de variation du signal de diffusion de la lumière en fonction du logarithme de la concentration du surfactant (figures 16 et 22) reflète clairement cette situation. La région de M_{n-1} qui est une région prémicellaire joue un rôle essentiel dans notre système. En s'approchant de la CMC du surfactant, on observe parallèlement la monomérisation rapide de l'antibiotique et l'accroissement de la sélectivité d'interaction de l'AmB avec l'ergostérol par rapport au cholestérol (Figure 28).

La monomérisation de l'AmB par les surfactants a été observée aussi par d'autres auteurs (Tasset *et al.* 1990 et 1991). Dans cette étude sur des mélanges de Fungizone et de surfactants, le fait que la Fungizone contienne le DOC n'était pas pris en considération. En fin de compte, le système étudié était composé d'AmB et de deux surfactants, le DOC et l'autre ajouté à la Fungizone. Dans ces conditions, on peut s'imaginer l'augmentation de la complexité du système par la possibilité d'interaction entre les molécules de deux surfactants, interaction qui est probablement en compétition avec celles de l'AmB et de chacun de ces surfactants. Les trois surfactants suivants ont été étudiés par cet auteur :

- Solulan C24, où le cholestérol constitue la partie lipophile, et le polyoxyéthylène, la longue partie hydrophile composée de 24 groupes d'oxyéthylène;

- Myrj 59, dont la partie hydrophobe contient une chaîne de 18 atomes de carbone et la partie hydrophile est constituée de 100 groupes d'oxyéthylène;
- Synperonic A50, avec de 13 à 15 atomes de carbone dans la partie hydrophobe et la partie hydrophile constituée de 50 groupes d'oxyéthylène.

Donc, la structure moléculaire de ces surfactants ressemble à la structure du Tween 80 qui était utilisé dans nos études et, comme ce dernier, ils ne permettent pas la monomérisation totale de l'AmB. Probablement la structure de leur partie hydrophile, très allongée, constitue un encombrement stérique, ce qui empêche l'antibiotique de s'insérer dans les micelles de ces surfactants ou les monomères de surfactant de réagir avec les molécules d'AmB qui, à cette concentration, font partie des agrégats-micelles d'antibiotique. Il est très probable que la longueur et la flexibilité de la partie hydrophobe des molécules de ces surfactants ne sont pas sans influence sur la monomérisation de l'AmB (Steiner C.A. 1991). D'après Tasset, l'interaction du surfactant avec les agrégats d'AmB s'effectue de la façon suivante : tout d'abord, le surfactant s'intercale entre les molécules d'AmB, mais celles-ci restent agrégées. Ensuite, pour les concentrations supérieures en surfactant, c'est le polyène qui, sous forme agrégée, s'intercale dans les micelles du surfactant. Ce n'est qu'à des concentrations encore supérieures que le surfactant parvient à dissocier les agrégats d'antibiotique et les transformer en monomères.

L'analyse des résultats que nous avons obtenus par les méthodes de :

- la spectroscopie d'absorption UV-VIS et DC;
- la diffusion de la lumière;

- la diffusion quasi élastique de la lumière ;
- la chromatographie d'exclusion par la taille; et
- l'ultracentrifugation;

montre les étapes de l'effet de surfactant sur la forme physique de l'AmB (voir le chapitre 4.1.3) différentes de celles proposées par d'autres (Tasset *et al.* 1990 et 1991; Lamy-Freund *et al.* 1989 et 1991). Selon nous, l'AmB est d'abord désagrégée pour ensuite se trouver, sous forme de monomères, dans les micelles de surfactant.

Il a déjà été entièrement démontré que le LS augmente la sélectivité cellulaire d'AmB sous forme de Fungizone (Gruda *et al.* 1988b et 1991). Dans nos travaux sur l'AmB, la courbe du signal de diffusion de la lumière en présence de LS est la plus prononcée. Egalement, le déplacement de la CMC de surfactant en fonction de concentrations croissantes d'AmB est observé seulement dans le cas de LS. Ces résultats nous permettent de conclure que de tous les surfactants étudiés c'est le LS qui manifeste la plus grande affinité envers l'antibiotique.

On trouve un comportement analogue de ce surfactant dans son interaction avec les protéines (Makino *et al.* 1991).

Ainsi :

- la liaison entre les molécules du LS et les protéines n'affecte pas la structure des protéines (Makino *et al.* 1983), ce qui est rare pour les surfactants;
- le LS est efficace dans la désagrégation, il rompt les liaisons hydrophobes entre les protéines;

- le LS stabilise la structure de la protéine libre, les molécules de surfactant couvrent la partie de protéine normalement plongée dans le milieu hydrophobe de la bicouche membranaire.

Il est connu que le sucrose seul a un effet stabilisateur sur la structure des protéines. Le fait que la partie hydrophile de la molécule de LS soit constituée d'un sucrose la rend apte à réagir avec les protéines d'une autre façon que la plupart des surfactants non ioniques. De tous les esters de sucrose, le LS est le plus efficace. Voici quelques chiffres décrivant les propriétés physico-chimiques du LS : le diamètre d'une micelle de LS est de 66 Å, le nombre de monomères dans sa micelle est de 120, la longueur de la molécule de LS est inférieure à 33 Å (Makino *et al.* 1991). Le caractère unique du LS et le fait que la longueur de la molécule d'AmB (27 Å) est presque identique à celle du LS, sont à la base de l'explication d'une grande affinité entre ces deux molécules.

En se référant aux études de l'interaction de la Fungizone avec le cholestérol et l'ergostérol en présence des esters de sucrose (Gruda *et al.* 1991), nos résultats de l'interaction des mêmes stérols avec l'AmB seule et en présence de LS ou de DOC, ont permis de confirmer l'effet de ces surfactants sur la sélectivité de l'interaction antibiotique-stérol.

Comme il a déjà été mentionné, on obtient le maximum de la sélectivité de l'AmB au moment de la CMC du surfactant présent dans la solution. Dans le cas de DOC, le fait que la valeur de sa CMC soit de $4,5 \times 10^{-3}$ M, que la concentration de Fungizone administrée aux malades ne dépasse pas 10^{-4} M et que les spectres de cette dernière solution présentent l'AmB agrégée, suggère que la concentration de surfactant administré est au moins 20 fois trop faible par rapport aux conditions de la sélectivité maximale de l'antibiotique.

Ayant comme but de diminuer la toxicité de l'AmB, il faut prendre en considération plusieurs phénomènes, le choix des surfactants pour l'étude n'est pas facile. Il existe des surfactants qui sont de puissants solubilisateurs et qui rendent l'AmB monomérique, mais leur présence ne permet pas la sélectivité de l'antibiotique (Barbeau N. 1990) ou, par exemple, dans le cas des études préliminaires sur le Triton X-100, elle facilite plus l'interaction AmB-cholestérol que AmB-ergostérol (Thibault E. 1990). Aussi les trois surfactants analysés par Tasset ne sont pas en mesure d'augmenter la sélectivité cellulaire de l'antibiotique sous forme de Fungizone. Ceci montre que la monomérisation de l'AmB n'est pas toujours un garant en soi de la diminution de sa toxicité.

La conséquence logique des résultats de cette partie de nos études est de continuer l'étude de l'effet des surfactants sur la toxicité sélective de l'AmB *in vitro* avec le sérum et *in vivo* avec les souris.

4.2 Effet de surfactants sur l'interaction de l'amphotéricine B avec des lipoprotéines ou avec le sérum

4.2.1 Méthodologie

Les méthodes d'absorption UV-VIS et de DC ont été utilisées pour étudier l'effet de surfactants sur le comportement de l'AmB en milieu constitué de sérum entier ou de sérum dépourvu des lipoprotéines, et dans des solutions aqueuses de différentes sortes de lipoprotéines (voir Annexe B-(1) et (2)).

4.2.2 Effet des lipoprotéines sur les différentes formulations de l'amphotéricine B

Récemment, de grands efforts sont faits pour améliorer l'efficacité thérapeutique de l'AmB. La stratégie principale consiste à développer de nouveaux systèmes de transport pour l'antibiotique (Mackaness G.B. 1990), qui abaisseraient la toxicité de l'AmB pour les cellules animales sans affecter son activité antifongique. Certaines de ces nouvelles formulations sont déjà utilisées pour les traitements en clinique (Lopez-Berestein *et al.* 1985). Pourtant, le mécanisme d'augmentation de l'indice thérapeutique par les nouveaux systèmes de transport du médicament n'est pas bien connu. D'un autre point de vue, l'administration de l'AmB par injection intraveineuse met le médicament en contact avec le sérum, donc avec tous ses composants. Il est connu que l'AmB s'associe aux lipoprotéines (Brajtburg *et al.* 1984; Koldin *et al.* 1985; Wasan *et al.* 1993), mais il y a peu de connaissances de la biodistribution de nouvelles formulations et de l'effet des véhicules utilisés sur l'interaction AmB-lipoprotéines.

Comment cette interaction est-elle modifiée par différentes formulations de l'AmB qui augmentent l'indice thérapeutique de l'antibiotique?

Est-ce que les nouveaux systèmes de transport modifient ou inhibent l'interaction AmB-lipoprotéines?

Si c'est le cas, pourquoi cette modification affecte-t-elle la toxicité de l'antibiotique pour les cellules des mammifères?

En essayant de répondre à ces questions, nous avons réalisé des études spectroscopiques de l'interaction entre les lipoprotéines de sérum et l'AmB sous forme de Fungizone, de l'AmB monomérisée par l'association avec le LS ou de l'AmB incorporée dans les micelles mixtes lécithine d'oeuf-acide glycocholique.

Le degré d'agrégation de l'AmB ainsi que la présence d'autres composants dans son environnement, modifient le spectre de l'antibiotique de telle façon qu'il en résulte un changement dans l'intensité, dans la position et souvent dans la largeur de ses bandes. Par exemple, l'association des molécules d'AmB avec les molécules de cholestérol provoque la diminution spécifique de la largeur des bandes du spectre (Figure 30).

La concentration d'AmB utilisée pour cette étude représente approximativement la concentration d'AmB dans le sang de souris qui ont reçu une dose de 3,2 mg/kg.

Les figures 31 et 32 comparent les spectres de la Fungizone dans le sérum avec ceux obtenus en présence de différentes fractions de lipoprotéines.

Dans deux cas présentés, on observe des changements spectraux par rapport au spectre de l'AmB à la même concentration dans du dextrose 5 %. Les paramètres spectraux de l'AmB comme la largeur à la mi-hauteur (HBW) et le rapport d'absorbances pour les longueurs d'onde choisies sont semblables (Tableau 7) pour le cas de la Fungizone dans le sérum total (ST) et dans le cas de l'AmB avec le cholestérol (Figure 30-(b)) ce qui permet de déduire que l'AmB contenue dans la Fungizone se lie aux lipoprotéines, probablement à leur cholestérol.

Par contre, le sérum sans lipoprotéines (SSL) (Figure 31-courbe B) cause seulement une monomérisation partielle de la Fungizone. Le milieu du sérum sans lipoprotéines à basse densité (LDL) et sans lipoprotéines à très basse

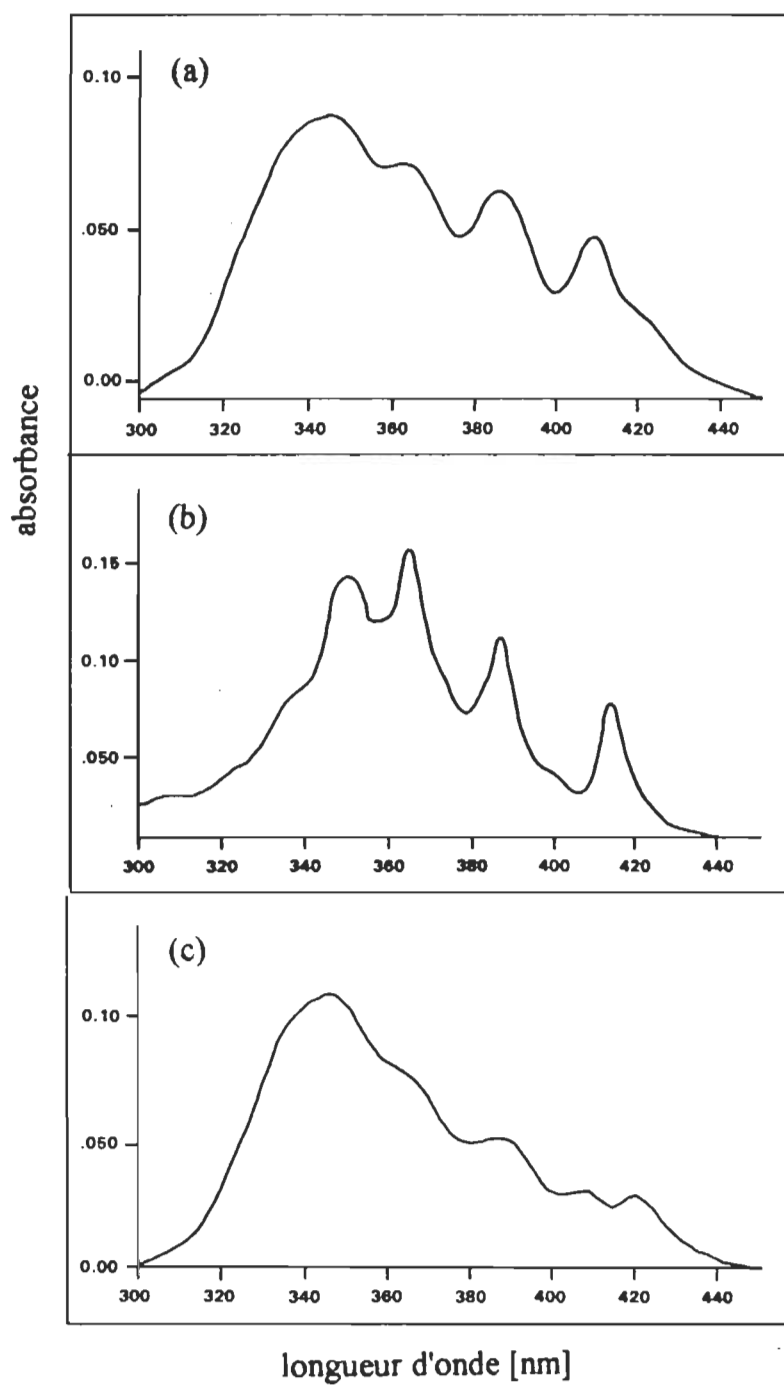


Figure 30. Spectres d'absorption d'AmB $2,6 \times 10^{-5}$ M dans une solution aqueuse de *n*-propanol 10%. (a) AmB seule; (b) AmB en présence de cholestérol (le rapport molaire cholestérol / AmB est de 5) et en solution aqueuse de dextrose 5 % (c)

Tableau 7

Les paramètres spectraux de l'AmB dans différents milieux.

Amphotéricine B			Bande 1 (B1)		Bande2 (B2)		Rapport d'absorbances	
Formulation	Concentration μM	Medium	λ_{max} nm	HBW nm	λ_{max} nm	HBW nm	B2/B1	B3 ^f /B1
AmB	26	n-propanol à 20%	409,2	12,3	385,1	16,0	1,00	0,71
AmB	26	n-propanol à 10%	408,4	16,0	385,9	24,0	1,32	1,53
AmB + chol ^a	26	n-propanol à 10%	413,8	8,7	386,6	11,3	1,47	2,04
AmB	0,5	SSL ^b	416,7	16,0	392,3	20,0	0,97	0,73
Fungizone	26	ST ^c	415,0	8,7	388,7	10,3	1,57	1,35
Fungizone	26	SSV,L ^d	416,0	14,3	390,2	19,3	1,11	0,89
Fungizone	26	SSL ^b	417,0	14,0	391,9	18,7	0,98	0,67
Fung + LDL	26	PBS ^e	415,0	8,7	388,7	10,3	1,57	1,35
Fung + VLDL	26	PBS ^e	415,0	8,3	388,7	10,0	1,71	1,51
micelles mixtes	9	ST ^c	415,6	12,3	390,2	16,6	1,02	0,69
AmB + LS	26	ST ^c	415,6	12,0	389,1	14,7	1,19	0,89

chol^a = cholestérol; SSL^b = sérum sans lipoprotéines; ST^c = sérum total; SSV,L^d = sérum sans VLDL et sans LDL;
 PBS^e = solution-tampon phosphate; B3^f = bande à 365 nm

densité (VLDL) (Figure 31-courbe A) conduit à la disparition partielle de l'interaction AmB-cholestérol.

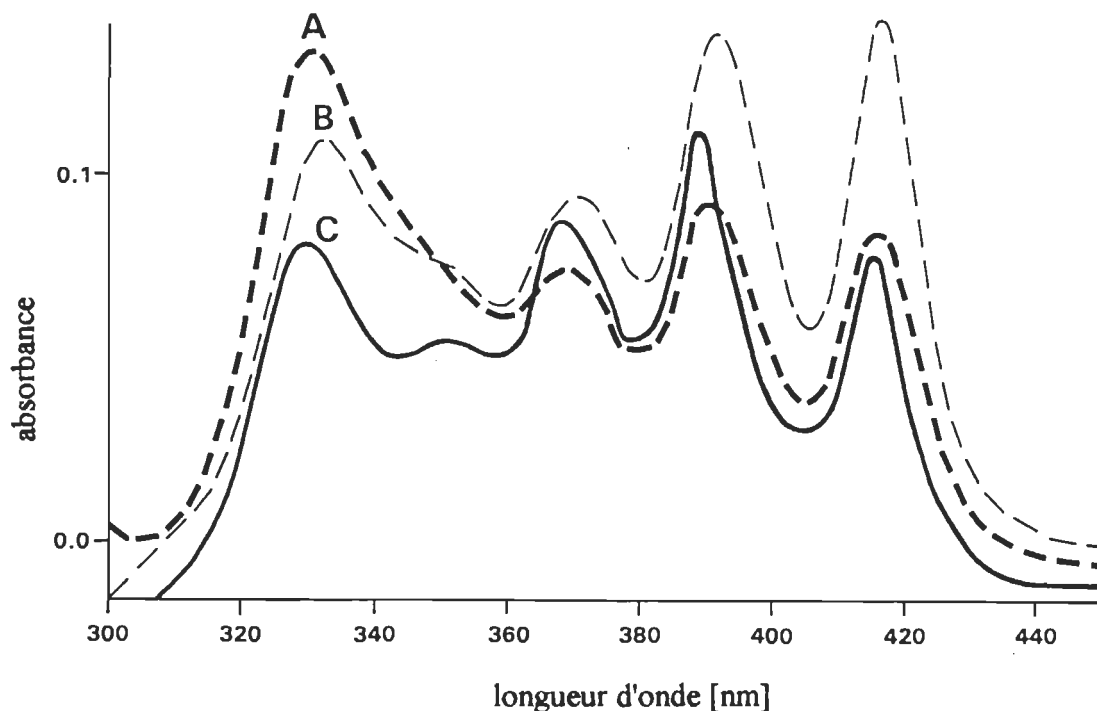


Figure 31. Spectres d'absorption UV-VIS de solutions d'AmB ($2,6 \times 10^{-5}$ M) sous forme de Fungizone dans du sérum sans VLDL et sans LDL (A); sérum sans lipoprotéines (B); sérum total (C)

Les spectres présentés sur la Figure 32 montrent l'interaction de l'AmB sous forme de Fungizone avec les fractions isolées de lipoprotéines. On peut voir clairement que l'antibiotique se lie avec les LDL et les VLDL, mais non avec les lipoprotéines à grande densité (HDL). Du fait que tous les spectres présentés correspondent au milieu contenant toujours la même concentration de cholestérol, on peut conclure que le cholestérol contenu dans les HDL est moins accessible pour l'AmB que celui contenu dans les LDL et dans les VLDL.

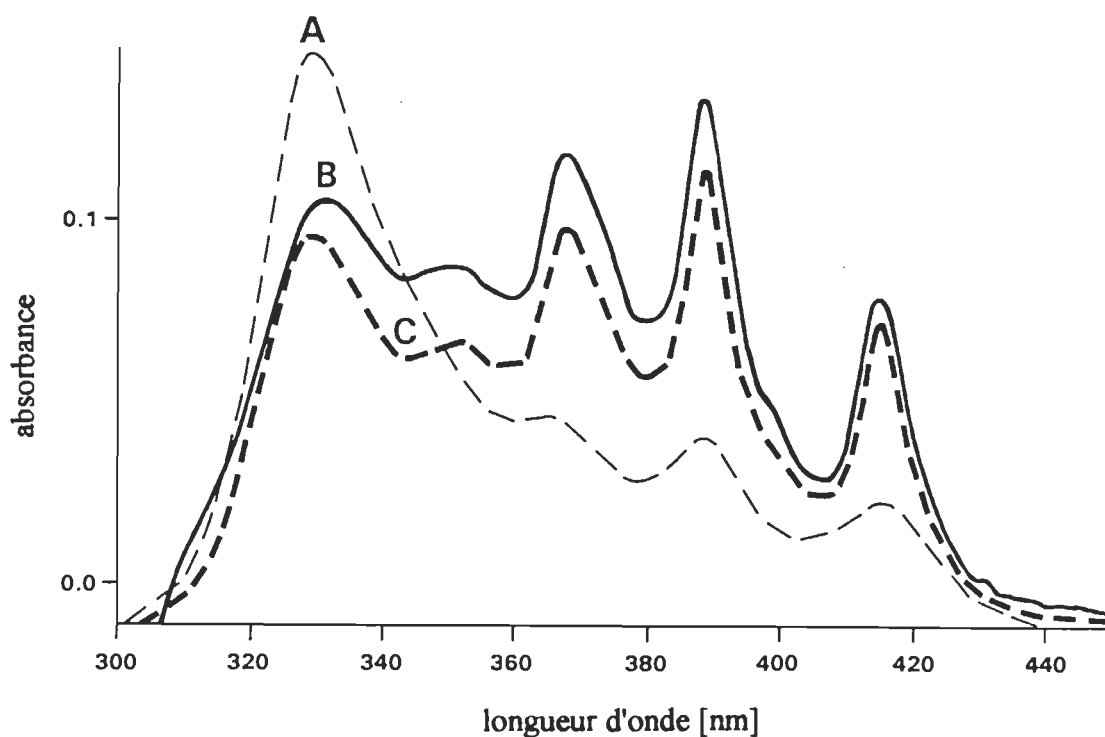


Figure 32. Spectres d'absorption UV-VIS de l'AmB ($2,6 \times 10^{-5}$ M) sous forme de Fungizone dans la solution tampon phosphate (pH=7,4), en présence des HDL (A), des VLDL (B) et des LDL (C). Chaque solution contient 5,4 mmoles de cholestérol lié aux lipoprotéines

Il faut remarquer que le spectre du mélange AmB-cholestérol dans la solution aqueuse à 10 % du propanol (Figure 30-(b)), est peu différent de celui de l'AmB avec les lipoprotéines. La plus grande différence se situe dans la région de la troisième bande. À titre explicatif, la bande 1 est celle de la plus grande longueur d'onde. Le rapport d'absorbances de la bande 3 à celle de la bande 1 (B3:B1) est de 2,04 pour le spectre du mélange AmB-cholestérol dans la solution propanol-eau (Figure 30-(b)) et de 1,3 à 1,5 pour les spectres de l'interaction d'AmB avec les VLDL et les LDL (Figure 32-courbes B et C). Ce n'est pas étonnant que la conformation de l'AmB est différente dans ces deux

cas. La présence de phospholipides et de protéines peut modifier considérablement l'interaction AmB-cholestérol, ce qui n'a pas de place dans le cas du cholestérol libre dans la solution aqueuse du propanol.

Quelques paramètres spectraux (HBW, B2:B1, B3:B1) d'interaction du ST avec l'AmB insérée dans les micelles mixtes lécithine d'oeuf-acide glycocholique ou avec l'AmB monomérisée par le LS, montrent des valeurs différentes à celles obtenues pour la Fungizone (Tableau 7).

Les résultats suggèrent que l'AmB sous sa forme presque entièrement monomérique ne se lie pas aux lipoprotéines. Ainsi, la formation de la liaison entre l'AmB et les lipoprotéines est inhibée aussi bien par la présence du LS que par l'insertion dans les micelles mixtes lécithine d'oeuf-acide glycocholique.

En vertu de l'étude présentée, et sachant que les formulations d'AmB où l'antibiotique est lié au LS ou incorporé dans les micelles mixtes mentionnées plus haut sont moins toxiques que la Fungizone (voir le chapitre 4.3), on peut supposer que la liaison AmB-lipoprotéines est toxique pour l'organisme animal. En conséquence, l'empêchement de la formation de ce complexe par les différentes formulations de l'antibiotique pourrait être bénéfique pour les malades.

4.2.3 Effet du surfactant (LS) sur l'amphotéricine B dans le sérum total et dans le sérum sans lipoprotéines

L'étude présente démontre l'effet de deux sortes de sérum sanguin sur le spectre DC de l'AmB, particulièrement sur la valeur de son doublet dichroïque.

La concentration d'AmB dans les solutions examinées correspond à la concentration d'AmB dans les solutions administrées aux souris, diluée 10 fois avec le ST, le SSL ou avec l'eau pour obtenir une concentration proche de celle qui est présente dans le sang des souris après l'injection. La Figure 33 présente les trois courbes de variation du doublet dichroïque de l'AmB dans les milieux différents en fonction de la concentration du LS, et la courbe de la mesure d'état d'agrégation de l'antibiotique ($1/R$).

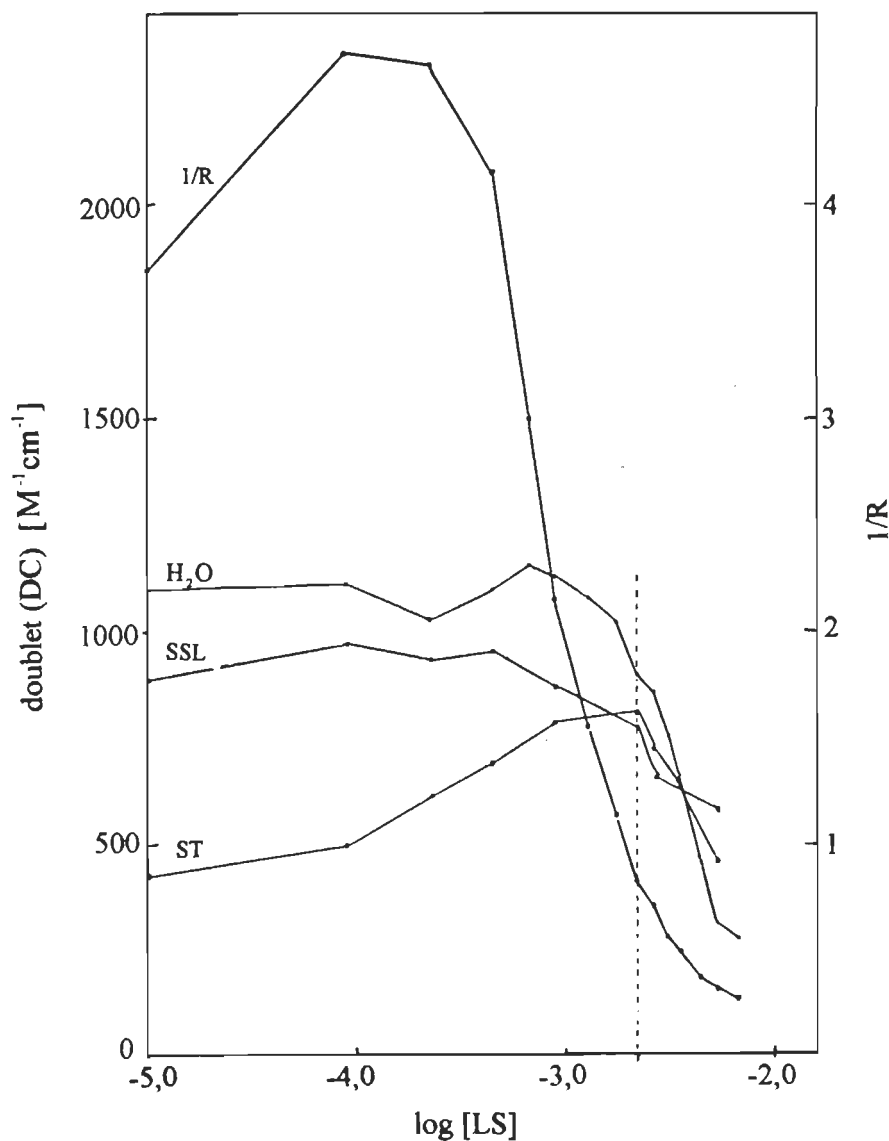


Figure 33. Effet du LS sur l'AmB ($4,5 \times 10^{-5} \text{ M}$) dans différents milieux

La ligne droite verticale indique la concentration du surfactant utilisée pour monomériser l'AmB dans les solutions à injecter. Ces mélanges se sont avérés moins toxiques que la solution de Fungizone (voir le chapitre 4.3.2).

En absence de surfactant, les trois environnements différents : eau, SSL et ST, donnent des valeurs du doublet de DC différentes de 1395, 750 et $340 \times 10^{-2} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ respectivement. La grandeur du doublet de l'AmB dans la solution de SSL est plus petite que celle de l'AmB dans l'eau, probablement à cause des réactions possibles de l'antibiotique avec les protéines présentes à 4 % dans le SSL et avec les lipoprotéines présentes à 1 % dans ce milieu. Ces interactions qui sont en concurrence avec l'agrégation de l'AmB, abaissent nettement la valeur du doublet dichroïque du polyène se trouvant dans le ST.

La Figure 34 présente les spectres de DC de l'AmB dans quatre différents environnements:

- eau,
- SSL,
- ST,
- SSL avec du cholestérol à une concentration équimolaire par rapport à celle de l'AmB, c'est-à-dire de $4,5 \times 10^{-5} \text{ M}$.

En comparant le doublet de DC de ces quatre spectres, on peut constater que le cholestérol et les composants du ST exercent le même effet sur l'AmB. Dans ces cas, le doublet a la même valeur et change le signe aux longueurs d'onde presque identiques. Le doublet dans le SSL est situé à la même longueur d'onde que celui dans l'eau, mais son intensité est plus basse.

La présence d'une concentration croissante de surfactant induit les plus grandes changements au doublet dichroïque de l'AmB se trouvant dans la solution de ST (Figure 33). Le LS, un concurrent de plus pour l'interaction avec

l'AmB, peut se lier aussi avec les molécules de lipides et de protéines. En fin de compte, à la concentration de LS utilisée pour monomériser l'AmB dans les solutions injectées aux souris (Figure 33, ligne verticale pointillée), les valeurs du doublet dichroïque sont semblables pour tous les milieux étudiés.

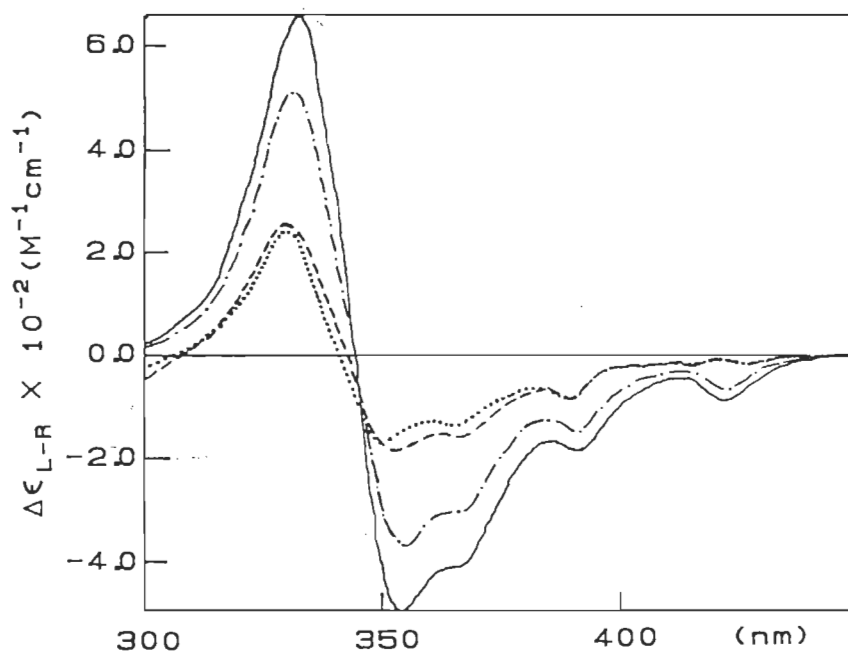


Figure 34. Spectres de DC de l'AmB ($4,5 \times 10^{-5}$ M) dans différents environnements : l'eau (—), SSL (---), ST (-.-.-), dans SSL avec une quantité équimolaire de cholestérol par rapport à l'AmB (....)

Ainsi, ces résultats confirment nos observations précédentes (voir le chapitre 4.1.3) concernant l'effet de la grande affinité du LS envers l'AmB et son rôle protecteur pour l'antibiotique, mais cette fois dans le milieu propre à l'organisme humain. Quand les spectres UV-VIS montrent l'AmB-monomère avec sa bande principale à ~ 413 nm, c'est-à-dire le spectre des molécules séparées d'antibiotique entourées par les molécules de LS, la protection est établie et les interactions de l'AmB avec d'autres composants du milieu sont inhibées.

4.2.4 Discussion

Les résultats des études spectroscopiques d'absorption UV-VIS et en DC du comportement de l'AmB en présence d'un surfactant dans le milieu du sérum total et du sérum sans lipoprotéines, présentent nettement un grand effet protecteur par le surfactant de l'antibiotique envers les composants du sérum. Jusqu'à présent, la réaction de l'antibiotique avec les lipoprotéines a été jugée comme un phénomène protecteur pour les érythrocytes et pour la membrane cellulaire. Étant donné que l'AmB se lie aux stérols ou à leurs dérivés, composants des lipoprotéines, la quantité d'AmB disponible pour les cellules diminue, de même que la toxicité du médicament baisse (Brajtburg *et al.* 1984; Kinsky S.C. 1963; Rebell G. 1966). Cela est contradictoire avec notre hypothèse que la liaison AmB-lipoprotéines est toxique pour l'organisme humain.

Cette contradiction suggère que la toxicité de l'association entre l'AmB et les lipoprotéines de sérum n'est pas due à un effet cytotoxique direct. Le manque de corrélation observée par les autres (Szoka *et al.* 1987) entre la létalité des préparations liposomales d'AmB *in vivo* et leur toxicité pour la culture des cellules peut avoir les même origines.

Il a été signalé récemment (Sawaya *et al.* 1991) que la principale cause de la toxicité de l'AmB est la vasoconstriction. On peut donc proposer l'hypothèse que l'AmB se liant aux lipoprotéines modifie leur métabolisme et que certains de ces métabolites peuvent provoquer la vasoconstriction.

Selon nos résultats, la présence d'une quantité du surfactant qui monomérise l'AmB empêche aussi son interaction avec le cholestérol des lipoprotéines. Si le cholestérol est difficilement disponible comme dans le cas des HLD, le spectre UV-VIS ne montre presque aucune interaction, ce qui n'est pas le cas des LDL et

des VLDL en présence desquelles l'AmB réagit de la même façon qu'avec le sérum total. La petite quantité de DOC présent dans la Fungizone n'est pas suffisante pour monomériser l'AmB et n'inhibe pas sa réaction avec le cholestérol des lipoprotéines.

Une récente étude (Wasan *et al.* 1993) d'une préparation liposomale de l'AmB, faite de phospholipide anionique DMPG et d'AmB de rapport molaire DMPG : AmB de 4, montre une faible incorporation de l'AmB dans les LDL et une faible toxicité intraveineuse. Les auteurs appuient notre hypothèse en suggérant que l'absence de lien AmB-LDL abaisse la toxicité de l'antibiotique.

4.3 Effet de surfactants sur la toxicité de l'amphotéricine B chez les souris

4.3.1 Méthodologie

Dans cette partie de l'étude, chaque préparation du médicament qui a servi à l'injection intraveineuse chez les souris a été examinée du point de vue de l'état d'agrégation de l'AmB par la méthode de spectroscopie d'absorption UV-VIS. La description détaillée du travail avec les souris se trouve à l'Annexe C.

4.3.2 Toxicité des mélanges amphotéricine B-surfactant chez les souris

Dans le but de trouver la meilleure corrélation entre l'état physique de l'AmB, sa sélectivité envers les stérols et sa toxicité *in vivo*, nous avons étudié la toxicité aiguë des différents mélanges AmB-surfactants. Ces mélanges contenaient de l'AmB sous forme de micelles mixtes AmB-surfactant à différents degrés de monomérisation de l'antibiotique.

Nous avons étudié, en particulier, trois surfactants.

Le premier, le DOC, surfactant ionique présent dans la formulation commerciale d'AmB, la Fungizone, a été utilisé à des concentrations qui induisaient une monomérisation plus importante de l'AmB que celle existant dans les solutions utilisées en clinique. Le rapport DOC : AmB dans la Fungizone est de 2; nous l'avons augmenté à 42.

Le second, le LS qui, en mélange avec l'AmB, a montré sa capacité d'augmenter la sélectivité toxique de l'AmB *in vitro*, a été utilisé à deux concentrations différentes qui provoquent deux états physiques différents de l'AmB décrits précédemment (voir le chapitre 4.1.3). La première concentration de LS représente l'état des micelles mixtes AmB-surfactant, où les agrégats-micelles de l'AmB sont saturés par les monomères de surfactant, ce qui correspond au maximum de diffusion de la lumière (voir la Figure 22). La deuxième concentration du surfactant est très proche de la valeur de sa CMC et correspond à l'état de la monomérisation presque totale de l'AmB. Sur la Figure 22, ce moment correspond à la région avant la CMC du surfactant, donc près du minimum du signal de la diffusion de la lumière.

Le troisième, Tween 80, bien connu pour sa toxicité intraveineuse exceptionnellement basse (Schick M. 1966), a été utilisé à une concentration permettant une monomérisation partielle de l'AmB.

Tous les résultats obtenus ont été comparés avec ceux réalisés avec la Fungizone où le rapport AmB : DOC est de 1 : 2 et où le polyène est présent sous forme agrégée.

Dans ce genre d'études *in vivo*, il y a des facteurs qu'il faut respecter comme par exemple le type de souris, le sexe, le poids. Une contrainte, dans notre cas, est le volume maximal qui peut être injecté à la fois et qu'on ne peut pas

dépasser. Il est de 0,2 ml par injection et par souris. Ainsi, si on veut administrer aux animaux des doses de 1 à 6 mg d'AmB par kilogramme, ce qui correspond à des doses thérapeutiques, les concentrations utilisées de l'antibiotique devront être relativement hautes et, par conséquence, l'antibiotique se trouve automatiquement à un degré d'agrégation très élevé.

Dans le chapitre 4.1.3, nous avons décrit que les surfactants donnent la possibilité d'obtenir des solutions assez concentrées d'AmB où l'antibiotique se trouve sous forme monomérique.

L'état d'agrégation de l'AmB de chaque solution injectée aux souris a été examiné par le spectre d'absorption en UV-VIS. Des exemples sont présentés sur la Figure 35 et sur la Figure 36. Tous ces spectres correspondent à la dose injectée aux souris de 4,4 mg d'AmB par kilogramme. Les résultats de l'expérimentation *in vivo* correspondant aux spectres de la Figure 35 se trouvent sous forme d'histogramme sur la Figure 37.

Chez les souris, on observe que la toxicité aiguë, évaluée comme un pourcentage de survivants 24 heures après l'injection des mélanges AmB-LS, est plus basse que la toxicité aiguë de la Fungizone. Néanmoins, cette différence est statistiquement significative ($P < 0,05$) seulement lorsque la Fungizone est comparée avec la solution où l'AmB existe sous forme presque entièrement monomérique. La faible reproductibilité des résultats ($P \gg 0,05$) pour la solution de micelles mixtes AmB-LS, où les monomères de surfactant sont incorporés dans les agrégats-micelles de l'antibiotique, rend cette formulation difficile à évaluer. Pour cette raison, cette préparation d'AmB est exclue de notre prochaine expérimentation.

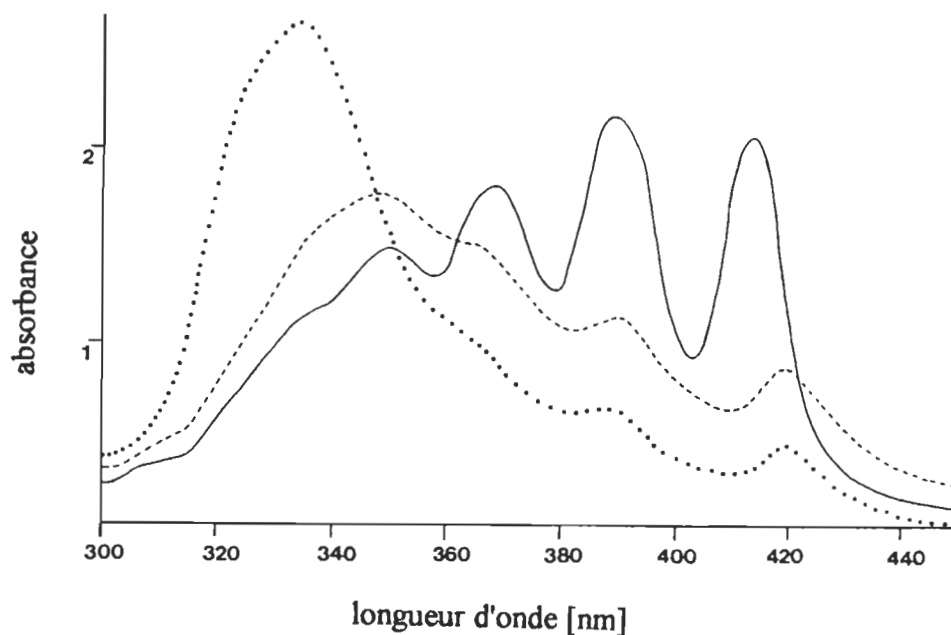


Figure 35. Spectres d'absorption de l'AmB à $4,76 \times 10^{-4}$ M dans la solution de dextrose 5 % : sous forme de Fungizone (····); en mélange avec le LS au rapport molaire LS : AmB de 2 (---) et au rapport molaire LS : AmB de 50 (—)

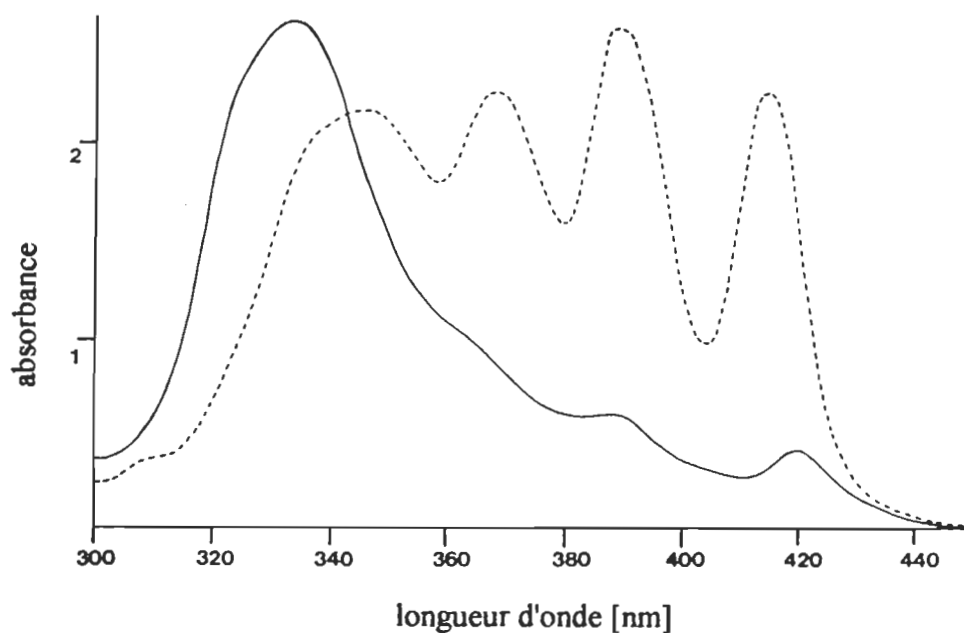


Figure 36. Spectres d'absorption de l'AmB à $4,76 \times 10^{-4}$ M dans la solution de dextrose 5 %: sous forme de Fungizone (—); en mélange avec le DOC au rapport molaire DOC : AmB de 42 (---)

La Figure 35 indique que la solution de la Fungizone présente le plus grand niveau d'agrégation de l'antibiotique. La solution de micelles mixtes où le rapport molaire AmB : LS est de 1 : 2, comprend aussi l'AmB agrégée. Seulement la solution à la concentration de LS proche de sa CMC où le rapport molaire AmB : LS est de 1:50 contient l'AmB presque totalement monomérisée.

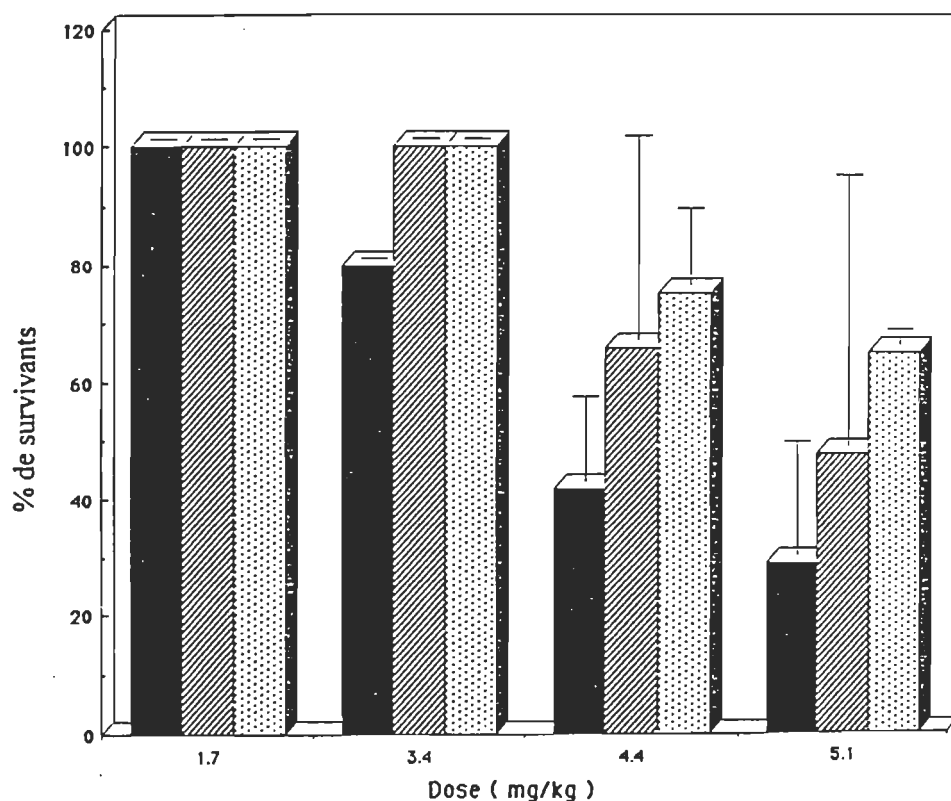


Figure 37. Toxicité aiguë chez les souris après administration de différentes doses d'AmB sous forme de Fungizone (■), micelles mixtes LS : AmB au rapport molaire de 2 (▨) et d'AmB monomérisée par LS avec un rapport molaire LS : AmB de 50 (▩)

La Figure 36 présente deux spectres : l'un de la solution de Fungizone, l'autre de la solution d'un mélange d'AmB et de DOC où le rapport molaire DOC: AmB est de 42, ce qui permet la monomérisation d'une grande partie de l'AmB.

En comparant les résultats des trois figures (Figures 35, 36 et 37), on peut suggérer que la présence d'une quantité du surfactant permettant la disparition de la forme agrégée du médicament au profit de la forme monomérique, abaisse la toxicité aiguë de l'AmB. Avec l'augmentation de la dose d'AmB injectée, cet effet est amplifié (Figure 38).

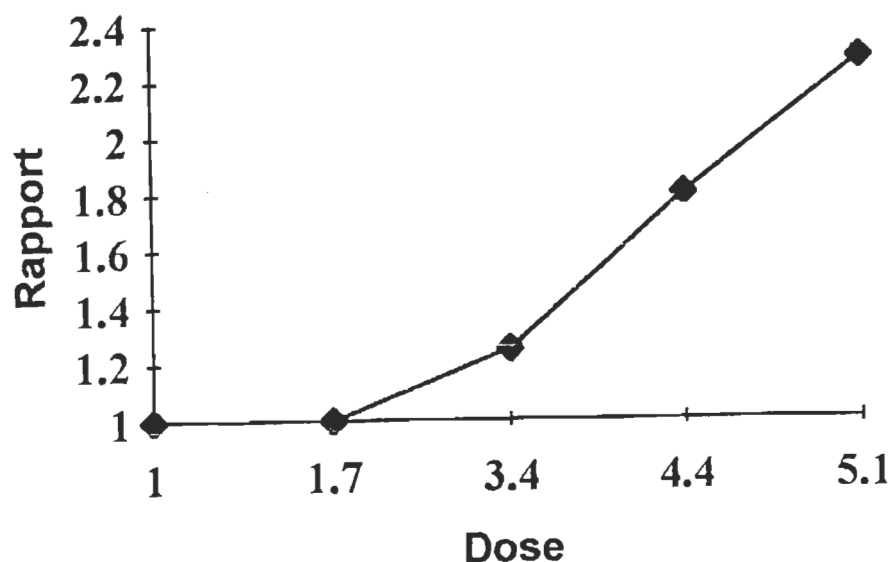


Figure 38. Variation du rapport entre le pourcentage de survivants après l'injection de la solution AmB-LS (rapport molaire LS : AmB de 50) et le pourcentage de survivants traités avec la Fungizone, en fonction de la dose d'AmB

L'étude de la toxicité à long terme de l'AmB (temps d'observation de trois semaines) avec une dose de 5,1 mg par kilogramme a donné les résultats présentés à la Figure 39. La toxicité de la solution de la Fungizone trois jours après l'injection a causé un taux de mortalité de 100 %, tandis que 32% des animaux traités avec le mélange de l'AmB et de LS ont survécu durant toute la période d'observation.

Du point de vue de la possibilité d'observation des changements pour toutes les formulations étudiées d'antibiotique, une dose de 4,4 mg d'AmB par kilogramme de souris nous paraît optimale.

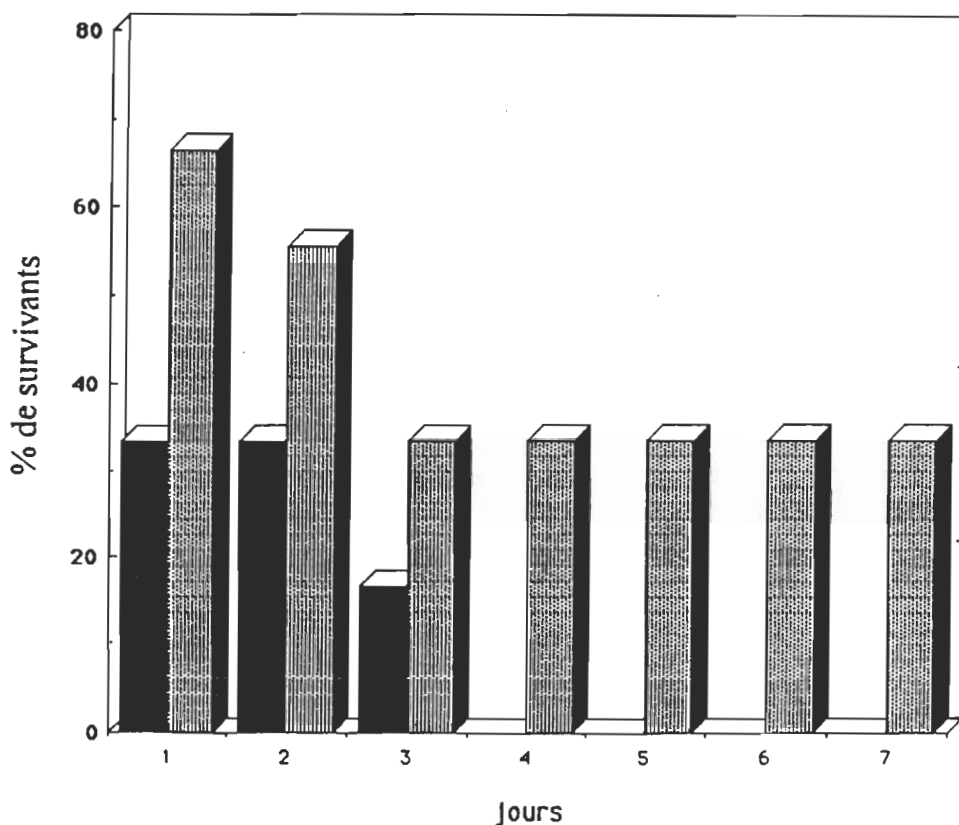


Figure 39. Toxicité de l'AmB chez les souris après administration d'une dose de 5,1 mg/kg sous forme de Fungizone (■), et d'AmB monomérisée par le LS avec un rapport molaire LS : AmB de 50 (▨)

La Figure 40 présente une comparaison des toxicités *in vivo* pour une dose d'AmB de 4,4 mg/kg contenue dans les solutions suivantes :

- la Fungizone, où le DOC se trouve à une concentration deux fois plus grande que l'AmB;

- le mélange DOC-AmB au rapport molaire de 42;
- le mélange LS-AmB au rapport molaire de 50.

Dans les deux dernières solutions, l'AmB est presque totalement monomérisée.

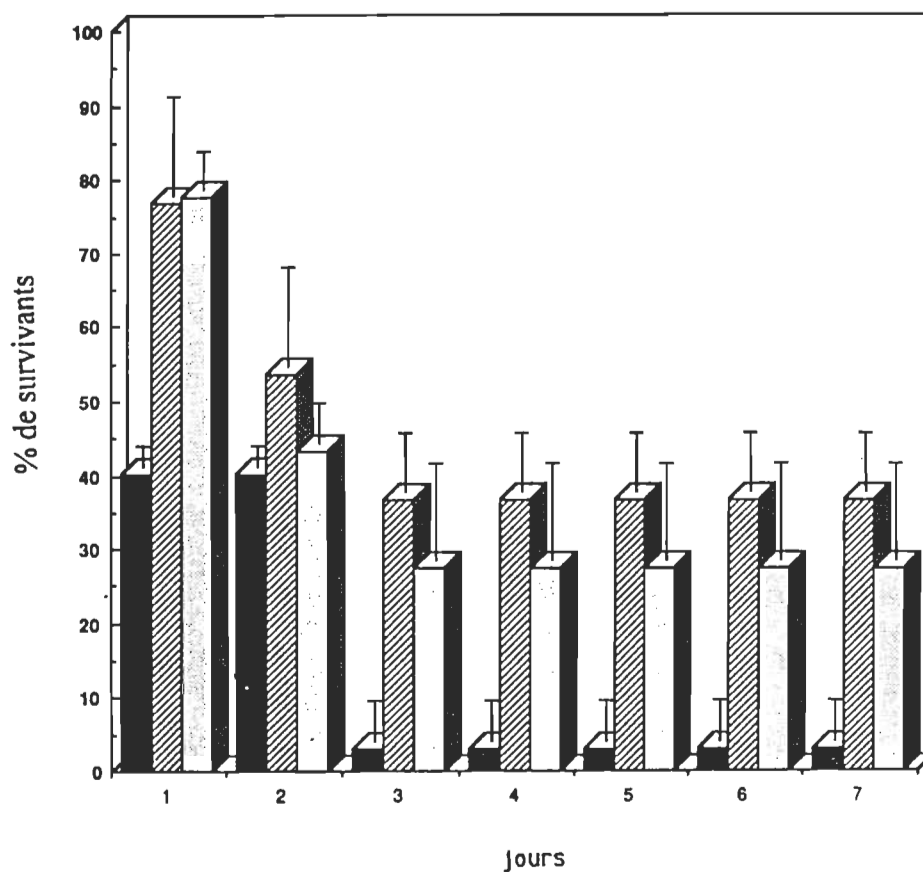


Figure 40. Toxicité de l'AmB chez les souris après administration d'une dose de 4,4 mg/kg sous forme de Fungizone (■), d'AmB monomérisée par le LS avec le rapport molaire LS : AmB de 50(▨) et d'AmB monomérisée par le DOC avec le rapport molaire DOC: AmB de 42 (□)

Les souris injectées ont été mises sous observation pendant trois semaines. Deux types de toxicité étaient observés. La première, qui se manifeste tout de suite après l'injection ou dans les premières heures qui la suivent, et la seconde

qui survient jusqu'au troisième jour et provoque une baisse importante du nombre de survivants. Après le troisième jour, le nombre de survivants se stabilise pour toutes les formulations étudiées. Les résultats présentés indiquent clairement une importante diminution de la toxicité dans le cas des préparations de l'AmB où l'antibiotique est monomérisé à l'aide d'un des deux surfactants, soit le LS ou le DOC, par rapport à la toxicité de la Fungizone. L'effet de l'accroissement de la concentration de DOC en mélange avec l'AmB entraîne une diminution de la toxicité du médicament. La différence entre le taux de mortalité des souris injectées avec la solution de AmB-LS (~64 %) et celui des souris après injection de la solution de l'AmB et de DOC (74 %), témoigne de l'effet protecteur très semblable du LS et du DOC pour l'antibiotique. Il faut ajouter que les solutions de LS et de DOC seules injectées aux souris aux mêmes doses que dans les mélanges avec l'AmB, n'étaient pas toxiques, c'est-à-dire que 100 % des souris ont survécu pour toute la durée de la période d'observation.

La comparaison des résultats exposés aux figures 35 et 36 avec ceux des figures 37 et 40, permet de conclure, et appuie fortement cette hypothèse, que la toxicité de l'AmB *in vivo* dépend de l'état d'agrégation de l'antibiotique.

Le troisième surfactant, Tween 80, est bien connu pour sa faible toxicité intraveineuse. Malheureusement, les solutions de l'AmB avec le Tween 80 injectées aux souris sont plus toxiques que la même quantité du surfactant seul dans la solution et plus toxiques que la solution de Fungizone. Par exemple, quand la dose de 1,7 mg d'AmB par kilogramme a été administrée aux souris, tous les animaux injectés avec la Fungizone survivent, contre 50 % dans le cas où l'AmB a été administrée dans 10 % (v/v) de Tween 80. La même dose d'AmB dans 20 % (v/v) de Tween 80 cause la mort de 75 % des animaux. Après injection de la solution de Tween 80 seul aux deux concentrations mentionnées

ci-haut, tous les animaux survivent. L'effet synergique observé est difficile à expliquer, mais considérant l'hypothèse selon laquelle l'état d'agrégation de l'AmB est en corrélation avec la toxicité *in vivo*, probablement l'incapacité de Tween 80 de briser totalement les agrégats-micelles de l'AmB (voir la Figure 19) aussi aux concentrations très élevées, peut contribuer à ce synergisme. Il faut prendre en considération aussi que dans la préparation des mélanges d'AmB-surfactant nous avons toujours utilisé l'AmB seule, ainsi que la toxicité de ces mélanges chez les souris a été comparée avec celle de la Fungizone, mais pas avec celle de l'AmB seule.

Deux nouveaux surfactants, F6C2MALT-1 et Hecameg (pour leur structure, voir Figure 14) monomérisent l'AmB agrégée. Le premier, F6C2MALT-1, un surfactant perfluoré dérivé du maltose, possède de très bonnes propriétés. Bien soluble dans l'eau, il est non hémolytique et non toxique par injection intraveineuse (Riess *et al.* 1991; Greiner *et al.* 1989). À cause de la trop petite quantité disponible de F6C2MALT-1 provenant d'un laboratoire qui a breveté ce nouveau surfactant, nous avons fait seulement une série d'injections aux souris avec la dose élevée d'AmB (5,5 mg/kg) et un rapport molaire F6C2MALT-1 : AmB de 50. Le résultat de 40% de survivants est un résultat meilleur qu'avec le LS (voir la Figure 39). En utilisant le F6C2MALT-1 synthétisé dans notre laboratoire nous avons obtenu un résultat différent. Pour une dose d'AmB de 4,4 mg/kg et pour le même rapport molaire surfactant-antibiotique 16 % de souris ont survécu, ce qui est un résultat moins bon qu'avec le LS ou le DOC (voir la Figure 40). Tenant compte des résultats des expériences dans lesquelles nous avons utilisé notre produit, on peut conclure que le F6C2MALT-1 est en mesure d'abaisser la toxicité de l'AmB par rapport à celle de la Fungizone, mais qu'il est beaucoup moins efficace que le LS ou le DOC. La propriété de F6C2MALT-1

comme substitut de sang pour transporter l'oxygène peut provoquer l'oxydation des molécules d'AmB. Un tel effet peut empêcher une plus grande diminution de la toxicité de l'antibiotique.

Le Hecameg, avec son caractère du surfactant non ionique qui désagrège des protéines et les solubilise sans les dénaturer, ressemble au LS. Malheureusement, ce nouveau surfactant non ionique, dans les études *in vivo*, n'est pas en mesure d'abaisser la toxicité du médicament. Le Hecameg seul s'avérerait trop toxique donc il n'est pas le bon candidat pour la préparation d'une formulation moins toxique d'AmB.

4.3.3 Discussion

Malgré de résultats encourageants, de nombreuses études effectuées avec les nouvelles formulations d'AmB sur les animaux et en clinique, la base moléculaire de la modification de la toxicité de l'antibiotique n'est pas bien connue.

L'AmB liposomale qui fait partie de ce groupe de préparations prometteuses a été étudiée de point de vue de sa plus basse toxicité par rapport à l'antibiotique seul (Szoka *et al.* 1987). Les auteurs observent que l'incorporation de l'AmB dans les liposomes ne change pas la distribution du médicament dans le tissu cellulaire, et que la nature de l'interaction AmB-membrane n'est pas modifiée par les lipides - composants des liposomes. Ils suggèrent que seulement le taux du transfert du médicament entre les liposomes et la membrane cellulaire animale ou la membrane des cellules fongiques peut définir le paramètre qui réduit la toxicité de l'AmB sans affaiblir son activité antifongique. Il n'est pas clair

pourquoi le taux de transfert est plus important dans le cas des cellules de mammifères que dans le cas des cellules fongiques.

Une hypothèse selon laquelle l'état d'agrégation de l'AmB peut être responsable de sa toxicité sélective (Gruda *et al.* 1988a) a été confirmée par les résultats d'étude sur l'AmB avec le cholestérol et l'ergostérol dans le milieu propanol-eau, ainsi que par l'étude de l'interaction Fungizone-stérol en présence de LS (Gruda *et al.* 1988b). Une observation semblable a été faite dans une étude sur modèles membranaires (Bolard *et al.* 1991). Les auteurs démontrent que l'AmB sous forme autoassociée induit la perméabilité aux ions K^+ dans les liposomes contenant du cholestérol et que chaque forme d'AmB, monomérique et autoassociée, exerce la fuite des ions K^+ des modèles membranaires contenant l'ergostérol. Ils supposent que chaque modification dans la formulation de l'AmB qui peut abaisser l'agrégation des molécules d'antibiotique dans l'eau peut aussi réduire sa toxicité. Les travaux sur l'utilisation des liposomes comme système de transport du médicament montrent que l'activité anticellulaire de l'AmB peut être attribuée à l'AmB restant en solution, c'est-à-dire non liée aux liposomes (Julien *et al.* 1989 et 1990). Dans la situation où seulement les monomères d'antibiotique sont présents dans la solution, la préparation d'AmB liposomale est non toxique pour les érythrocytes (Julien *et al.* 1989). Dans ce sens, leurs résultats sont en accord avec notre hypothèse selon laquelle la toxicité sélective de l'AmB dans différents systèmes de transport est liée à la présence de l'AmB monomérique dans le système et que la formulation la plus sélective et la moins toxique d'AmB est une solution où l'antibiotique est presque totalement monomérique. Pourtant, la CMC de l'AmB est très basse ($6,0 \times 10^{-7} M$), et les doses thérapeutiques relativement élevées. Donc, pour administrer la dose normale quotidienne d'AmB (de 0,5 à 1,5 mg/kg) sous forme monomérique, on

devrait introduire un volume de 60 à 180 litres dans les veines du patient. Le DOC dans la Fungizone avec un rapport molaire DOC : AmB de 2, aide à solubiliser l'AmB dans l'eau à une concentration 1000 fois plus grande, mais l'antibiotique reste presque entièrement agrégé dans ces solutions. Ainsi, le DOC résout le problème de la solubilité de l'AmB, mais n'améliore pas sa sélectivité.

Les résultats de notre étude présentés dans le chapitre 4.1 montrent que les autres surfactants permettent d'obtenir des solutions concentrées d'AmB dans lesquelles l'antibiotique se trouve sous forme monomérique ou presque totalement monomérique. Cependant, les concentrations de surfactant nécessaires pour induire la monomérisation de l'AmB dans les solutions concentrées sont proches des CMC de ces surfactants et, par conséquent, ces solutions peuvent être très toxiques.

La toxicité des esters de sucrose diminue quand la chaîne aliphatique est plus courte. Par exemple, la toxicité du palmitate de sucrose ou du myristate de sucrose, mesurée par la fuite des ions K^+ ou par le degré d'hémolyse, est 10 fois plus grande que pour le caprate de sucrose (Gruda *et al.* 1991). Cette corrélation est en accord avec les données de la littérature qui montrent que la toxicité des surfactants non ioniques augmente avec l'allongement de leur partie lipophile (Ernst *et al.* 1980).

La valeur de la dose létale quand 50% de sujets survivent (LD_{50}) pour le LS est de 210 mg par kilogramme (Gruda *et al.* 1991). Dans nos études *in vivo*, nous avons utilisé des doses inférieures à 150 mg de LS par kilogramme. En se rappelant que, en présence d'une concentration croissante d'AmB la CMC du LS augmente (voir le Tableau 6), on peut souligner que nous avons travaillé à des concentrations non toxiques de ce surfactant..

Dans une des rares études où la corrélation entre l'inhibition de la toxicité de l'AmB chez les souris et l'inhibition de la toxicité de l'AmB envers les érythrocytes et les cellules L929 provenant de souris a été bonne, l'antibiotique a été utilisé sous forme de Fungizone et mélangé avec le LS (Gruda *et al.* 1991).

Les résultats et les conclusions de notre étude *in vitro* (chapitres 4.1 et 4.2) sont à la base de nos études *in vivo*. Dans le cas des mélanges AmB-LS, deux rapports molaires LS : AmB ont été utilisés. Le premier, de 2, où les molécules de LSaturent les agrégats-micelles d'AmB et le deuxième, de 50, où l'AmB est présentée dans le milieu sous une forme presque entièrement monomérique. Ces deux préparations sont moins toxiques chez les souris que la solution de Fungizone. La toxicité aiguë est plus que deux fois inférieure à celle de la Fungizone (voir Figure 39). Dans le premier cas, le cas des micelles mixtes AmB-LS, nous avons observé une grande variation des résultats, qui rend la comparaison statistique non significative. On peut suggérer que la toxicité de ces micelles mixtes AmB-LS est plus basse que celle de la Fungizone parce que les composants du sérum brisent cette structure plus facilement en libérant l'AmB-monomère. Ce phénomène est possible à condition que les agrégats-micelles d'AmB soient pleinement saturés par les molécules de surfactant. Le point exact de saturation jusqu'à la monomérisation immédiate par le sérum après l'injection n'est pas facile à trouver, ce qui explique probablement la mauvaise reproductibilité des résultats *in vivo* avec les mélanges de rapport molaire LS : AmB de 2. Les spectres des préparations d'AmB administrée aux souris indiquent la présence d'une large bande dominante au maximum près de 330 nm sur le spectre de la solution de la Fungizone et la participation minime de cette bande sur le spectre du mélange des micelles mixtes AmB-LS (voir Figure 35). La question suivante se pose :

- Est-il possible que l'oligomère d'AmB caractérisé par la bande près de 330 nm sur le spectre soit plus toxique que celui représenté par la bande à 347 nm ?

Nous essayons de trouver la réponse dans le chapitre 4.4.

L'observation pendant trois semaines de souris injectées avec une dose de 4,4mg d'AmB par kilogramme sous forme de Fungizone et en mélange avec le LS ou avec le DOC (voir Figure 40), montre que ces deux surfactants à une concentration qui force la monomérisation de l'AmB diminuent la toxicité de l'antibiotique et que cet effet est spécialement très important après le troisième jour d'observation. L'effet du LS est plus fort que celui du DOC, mais les spectres indiquent que dans les solutions avec le LS, l'AmB était plus monomérisée que dans les solutions avec le DOC. Le pourcentage de survivants après le troisième jour ne change pas jusqu'à la fin de la période d'observation : 6 % de souris traitées avec la Fungizone, 28 % et 38 % de celles traitées respectivement avec les mélanges AmB-DOC et AmB-LS ont survécu durant la période de trois semaines. Avec le F6C2MALT-1 nous avons obtenu 14 %. Donc, dans ces conditions, les trois surfactants, un ionique et deux autres non ioniques, se comportent de même façon en abaissant significativement la toxicité.

Les résultats *in vivo* avec l'AmB mélangée au Tween 80 (un surfactant peu toxique) présentent un phénomène d'une très grande potentialisation pour la toxicité de l'AmB. Le synergisme est difficile à expliquer. L'incapacité du Tween 80 de monomériser totalement l'antibiotique est un des facteurs qui peut causer l'augmentation de la toxicité du médicament.

En conclusion, les résultats de nos études *in vivo* et *in vitro* révèlent une bonne corrélation entre l'état physique de l'antibiotique et sa toxicité chez les souris.

L'absence totale dans les mélanges peu toxiques, de la bande à 421 nm, et l'absence presque totale de la bande à ~328 nm, deux bandes qui représentent des formes agrégées de l'AmB sur les spectres UV-VIS, suggèrent que ces formes sont responsables, du moins en partie, de la toxicité du médicament.

4.4 Modèle de l'organisation spontanée de l'amphotéricine B dans le milieu aqueux

4.4.1 Naissance d'une hypothèse de pore hydrophobe

L'activité sélective de l'AmB dépend de son état d'agrégation ce qui a été démontré par des études *in vitro* (Bolard *et al.* 1991; Gruda *et al.* 1988b et 1991). Nos résultats décrits dans le chapitre 4.3 montrent aussi une corrélation évidente entre l'état d'agrégation et la toxicité *in vivo* de l'AmB. En conséquence, l'étude de la structure des agrégats d'AmB est de grande importance pour mieux comprendre le mécanisme moléculaire de la sélectivité et de la toxicité de l'AmB (Mazierski *et al.* 1982).

La molécule amphiphile d'AmB avec sa structure très spéciale, un côté hydrophobe et l'autre hydrophile, entre dans le processus complexe d'agrégation-micellisation en milieu aqueux. Il est généralement accepté, comme une simplification raisonnable de ce processus, que la force principale conduisant à

l'agrégation est la réduction de la surface des parties non polaires des molécules exposées à l'eau, par analogie aux principes régissant la formation de micelles (voir le chapitre 4.1.5).

Dans le cas des surfactants ordinaires contenant une chaîne aliphatique et une tête polaire, comme par exemple le lauryl sulfate de sodium (SDS) ou le bromide de tétradécyltriméthyle d'ammonium (TTAB), cela est accompli par la formation dans l'eau de structures micellaires, le plus souvent sphériques, avec les parties polaires à l'extérieur et les parties hydrophobes dirigées vers l'intérieur (Atwood *et al.* 1983), où contrairement aux vésicules lipidiques, il n'existe pas de milieu aqueux à l'intérieur.

Les micelles des acides choliques, par exemple du DOC, limitées stériquement par la structure rigide d'un côté hydrophobe et de l'autre côté hydrophile, ont une forme différente qui permet l'exposition minimale des parties hydrophobes et l'exposition maximale des parties polaires de la molécule à l'eau (Jou *et al.* 1991; Mazer N.A. 1990).

La structure très particulière de la molécule d'AmB (voir la Figure 1) ne permet pas d'imaginer facilement l'arrangement moléculaire du plus petit agrégat, l'oligomère en solution aqueuse. Pourtant, il est généralement accepté que dans les membranes phospholipidiques, l'AmB associée ou non au stérol, forme des pores hydrophiles (voir le chapitre 2.2.1.1) dans lesquels les molécules d'AmB sont orientées quasi parallèlement avec leurs parties polaires pointées vers l'intérieur du pore, et les parties hydrophobes vers l'extérieur (Andreoli T.E. 1974; De Kruijff *et al.* 1974a et 1990; Finkelstein *et al.* 1973; Ganis *et al.* 1971; Lematre *et al.* 1977). Dans un tel arrangement, les parties non polaires des molécules d'AmB restent en contact avec les chaînes aliphatiques des

phospholipides membranaires et les groupes polaires du polyène forment des liaisons hydrogènes avec les molécules d'eau à l'intérieur du pore. La présence de ces pores dans la membrane cellulaire augmente sa perméabilité et peut endommager les cellules (Aracava *et al.* 1981; Cohen B.E. 1986; Vertut-Croquin *et al.* 1983).

La base du modèle de pore s'appuie sur les faits suivants :

- l'AmB réagit avec le cholestérol et avec l'ergostérol et à partir de ce moment, les stérols ne se lient plus avec les lipides;
- l'interaction AmB-stérol est hydrophobe;
- la stoechiométrie de l'association AmB-cholestérol est proche de l'unité;
- la perméabilité observée dépend de la concentration d'AmB et indique qu'il faut de cinq à huit molécules d'AmB dans un demi pore pour former le pore conducteur;
- le diamètre du pore approche le diamètre de la molécule de glucose;
- la molécule intacte du polyène est nécessaire pour la construction du pore, l'hydrolyse du cycle lactonique ou la saturation du chromophore ne permettent pas la formation du pore.

En conséquence, nous avons formulé l'hypothèse suivante :

Si ce type d'arrangement moléculaire, le pore hydrophile, cache suffisamment les groupes polaires des molécules d'amphotéricine B en milieu lipidique, la même forme peut être possible dans la situation inverse, donc en milieu aqueux. La forme similaire d'orientation moléculaire est le pore hydrophobe, structure qui cache les côtés hydrophobes des molécules d'amphotéricine B dans son intérieur et dirige ses côtés polaires vers l'extérieur, vers l'eau.

La Figure 41 présente le modèle d'un pore hydrophile d'AmB dans la bicouche lipidique en coupe transversale et la structure probable d'un pore hydrophobe faite par inversement géométrique de la forme précédente.

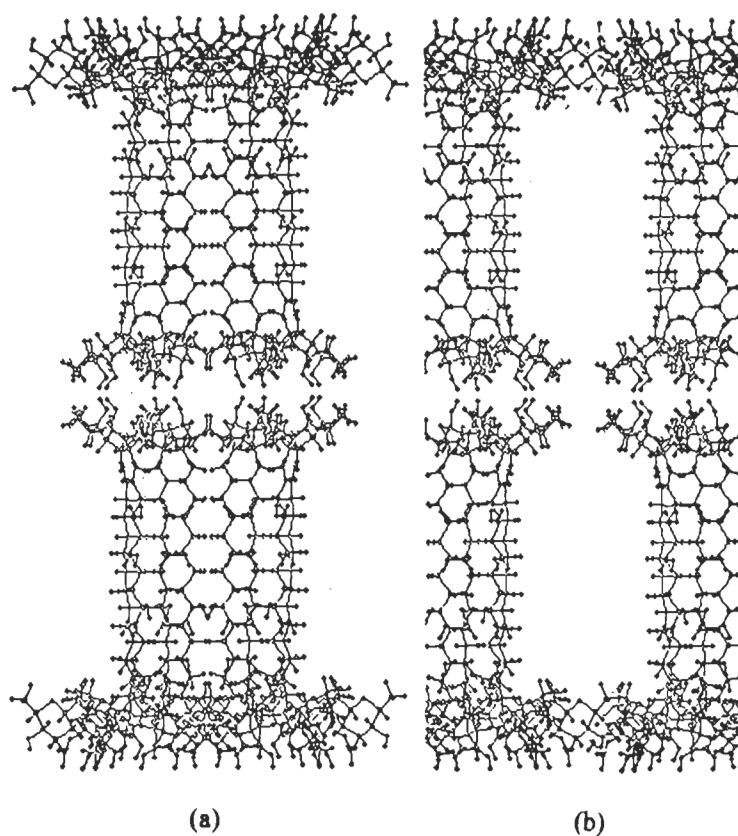


Figure 41. Coupe transversale d'un modèle du pore hydrophile d'AmB (a) (d'après Bonilla-Marin *at al.* 1991) et d'une structure probable d'un pore hydrophobe (b) élaborée d'après la forme précédente

4.4.2 Modèle des structures agrégées de l'amphotéricine B en milieu aqueux

Selon notre hypothèse du pore hydrophobe mentionnée ci-dessus, et en nous basant sur les données spectroscopiques et sur la théorie des excitons (Davydov

A.S. 1962; Hochstrasser *et al.* 1964; Kasha M. 1963 et 1964; Kasha *et al.* 1965; Mc Rae E.G. 1961; Mc Rae *et al.* 1964), nous proposons dans ce chapitre les types de structures possibles pour les agrégats d'AmB en milieu aqueux.

Normalement, l'agrégation des molécules des polyènes se reflète dans les changements de leurs propriétés spectrales. Ces changements sont le résultat d'interaction entre les molécules identiques du même composé. Il est connu que l'effet de cette interaction dépend des valeurs énergétiques. La classification des interactions moléculaires de Simpson et Peterson (Simpson *et al.* 1957) correspond le mieux au cas de notre système. Les auteurs différencient la forte interaction excitonique qui se caractérise sur le spectre par une largeur de la bande excitonique ($2U$) beaucoup plus grande que celle de la bande correspondante au passage de l'électron dans le monomère (ΔE), et l'interaction faible pour laquelle $2U \ll \Delta E$. Dans le cas d'une forte interaction excitonique avec un nombre suffisamment grand de molécules en interaction, la structure vibrationnelle disparaît complètement. Les changements spectraux dans le cas d'une forte interaction excitonique sont explicables qualitativement si on les traite comme des interactions classiques entre les moments de transition des molécules séparées. C'est pour cela qu'il faut se rendre compte des orientations possibles des moments de transition pour la structure assumée de l'agrégat. Si les moments de transition sont orientés de telle façon que les dipôles électriques analogiquement orientés se repoussent, on observe sur le spectre un déplacement de la bande principale du monomère vers les plus grandes énergies, donc vers le violet. L'attraction entre les dipôles provoque une diminution de l'énergie d'excitation et le déplacement vers le rouge. Si les moments de transition sont orientés de telle manière que la somme de leurs vecteurs est égale à zéro, ce passage électronique est interdit et est invisible sur le spectre d'absorption. Cette

règle, une composante de la théorie des excitons, est décrite par Kasha (Kasha M. 1963 et 1964; Kasha *et al.* 1965; Hochstrasser *et al.* 1964), et elle est particulièrement utile dans l'analyse du spectre des molécules de polyènes, dont la direction du moment de transition est presque parallèle au grand axe de la molécule. Le déplacement spectral causé par l'agrégation de chromophores peut être calculé d'après Kasha à l'aide de la formule suivante :

$$\Delta\nu = 2 \left(\frac{N-1}{N} \right) \frac{\mu^2}{l^3} (\cos\beta - 3\cos^2\theta) \quad [1]$$

où : $\Delta\nu$ = déplacement spectral qui accompagne l'agrégation, [cm^{-1}]

N = nombre des molécules en interaction

l = distance entre les centres des molécules voisines, [\AA]

μ = moment de transition du dipole électrique; pour l'AmB, il a une valeur de $2,6 \times 10^3 (\text{cm}^{-1} \text{\AA}^3)^{1/2}$

θ = angle entre la ligne reliant les centres de deux molécules voisines et la direction du moment de transition,

β = angle entre les deux plans définis par les axes de polarisation de chaque molécule et la ligne reliant les centres de deux molécules.

Avec une interaction excitonique faible, il y a un découplage de chaque sous-niveau vibrationnel séparément. Les découplages sont très petits par rapport à la largeur de la bande de monomère et le spectre d'absorption ne change pratiquement pas. Il y a seulement un changement du coefficient d'extinction.

4.4.2.1 Premier agrégat

Il est clair que l'agrégation de l'AmB représente un cas d'interaction excitonique forte. La Figure 42 montre le spectre de la forme monomérique d'AmB dans une solution de propanol 40 % et le spectre de l'AmB partiellement agrégée dans l'eau. On observe que le phénomène d'agrégation des molécules d'AmB s'accompagne de deux déplacements spectraux de la bande principale du monomère d'AmB, un effet hypsochromique et l'autre effet, bathochromique.

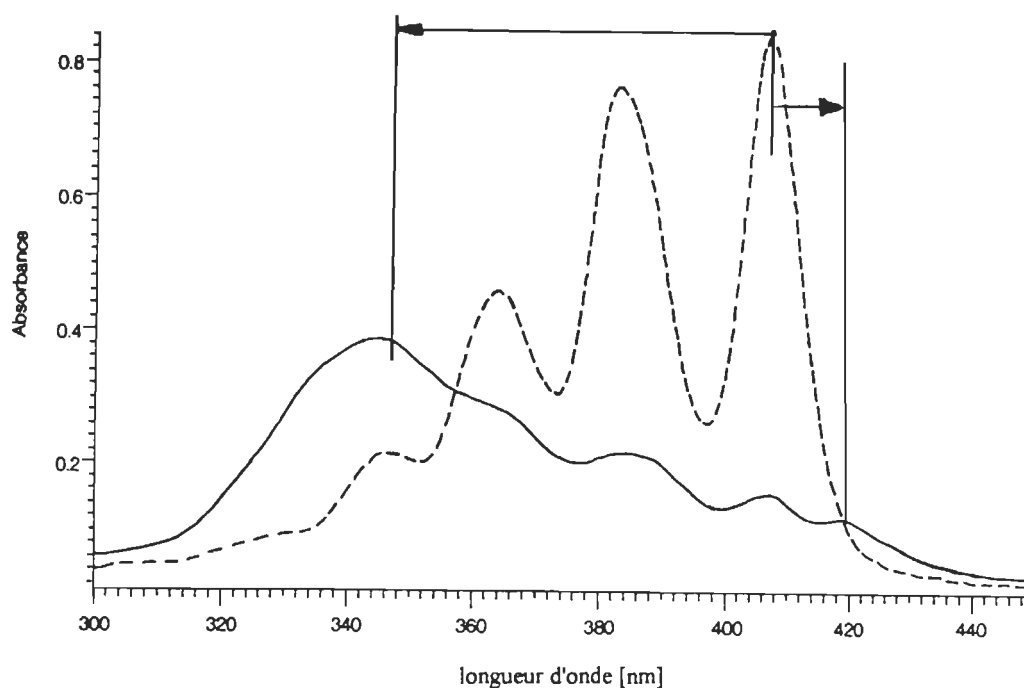


Figure 42. Spectres de la forme monomérique de l'AmB dans 40 % de *n*-propanol (---) et de la forme partiellement agrégée dans l'eau (—). La concentration de l'antibiotique est de $6,5 \times 10^{-6}$ M. Les déplacements spectraux sont marqués

Les nouveaux maximums dus à l'agrégation se trouvent à 347 nm (28 818 cm^{-1}) et à 421 nm (23 763 cm^{-1}). En considérant que l'apparition de ces maximums est le résultat du déplacement de la bande principale (0-0 transition) présente sur le spectre du monomère à 409 nm (24 450 cm^{-1}), les valeurs du déplacement bathochromique et du déplacement hypsochromique sont de -687 cm^{-1} et de + 4368 cm^{-1} respectivement.

D'après ce qu'il a déjà été mentionné, il est très probable que le pore, organisation moléculaire de l'AmB dans un environnement lipidique, peut être considéré comme le modèle inverse de l'agrégation spontanée de l'AmB dans le milieu aqueux. La structure du pore hydrophobe assure :

- une protection efficace des parties hydrophobes contre l'eau,
- une bonne interaction des groupes polaires avec le solvant.

La Figure 43 présente le schéma d'un fragment de pore hydrophobe élaboré d'après les données de la littérature pour les pores hydrophiles de l'AmB (Bonilla-Marin *et al.* 1991).

Les formes cylindriques représentent les chromophores des molécules d'AmB en interaction. Le nombre inconnu des unités élémentaires formant un pore ne permet pas de calculer directement le déplacement hypsochromique qui accompagne l'interaction excitonique des molécules voisines, séparées par la distance d .

La distance entre les centres de deux molécules voisines selon une orientation "tête-à-queue" ($\rightarrow\rightarrow$), le long de l'axe moléculaire, le paramètre D est estimé à 27 Å (Bonilla-Marin *et al.* 1991). Les résultats de l'intégration du spectre de l'AmB monomérique ont permis de calculer le moment de transition d'après la procédure générale décrite dans la littérature (Rohatgi-Mukherjee K.K.

1978). Ainsi, il est possible de calculer le déplacement spectral induit par cette structure dimérique.

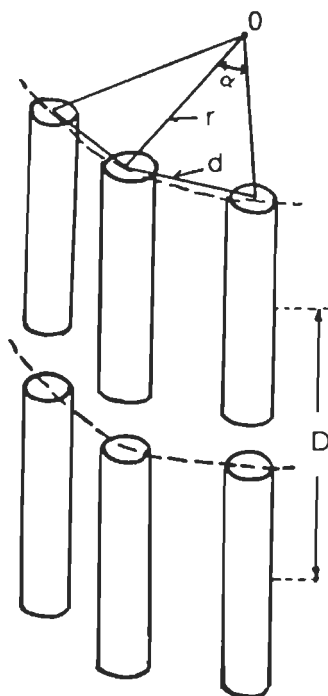


Figure 43. Schéma d'un fragment d'organisation moléculaire de l'AmB dans l'eau.

Seuls les chromophores des molécules d'antibiotique sont indiqués

D'après l'équation [1] et quand:

$N = 2$; $\Theta = 0^\circ$; $\beta = 0^\circ$; $l = D = 27 \text{ \AA}$ et $\mu = 2,6 \times 10^3 (\text{cm}^{-1} \text{ \AA}^3)^{1/2}$ en unités qui conviennent pour les calculs directs, on obtient :

$$\Delta \mathfrak{G} = -687 \text{ cm}^{-1}$$

Cette valeur de déplacement spectral est en parfait accord avec la valeur expérimentale (-687 cm^{-1}) observée sur le spectre d'absorption (voir Figure 42) et confirme l'existence de l'orientation dimérique "tête-à-queue" ($\rightarrow\rightarrow$) des chromophores de l'AmB.

En connaissant la valeur expérimentale de l'effet hypsochromique (+4368 cm^{-1}) de l'agrégation caractérisé par l'organisation "côte-à-côte" qui peut être représenté par les flèches parallèles ($\uparrow\uparrow$), et en assumant comme N , le nombre particulier de monomères en interaction, on peut calculer la distance intermoléculaire d (voir la Figure 43) d'après l'équation [1]. Les résultats des calculs sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8

Résultats des calculs des paramètres d , r , r' pour l'agrégat d'AmB avec le maximum d'absorbance à 347 nm

N	d [Å]	α [deg]	r [Å]	r' [Å]
4	13,32	90	9,42	2,42
5	13,61	72	11,58	4,58
6	13,80	60	13,80	6,80
7	13,93	51,4	16,06	8,06
8	14,03	45	18,33	11,33

Le paramètre r présenté dans ce tableau caractérise le rayon du pore hydrophobe formé par un nombre particulier N de molécules en agrégation et séparées par une distance d , calculée selon des données spectroscopiques. Si une organisation similaire des chromophores existe dans le pore hydrophile et dans le pore hydrophobe, le rayon réel du pore hydrophile est :

$$r' = r - 7 \text{ Å} ,$$

où la valeur de 7 Å est une distance estimée entre le côté de la molécule contenant le système des doubles liaisons conjuguées et son côté opposé polaire (Bonilla-Marin *et al.* 1991). La Figure 44 explique cet arrangement.

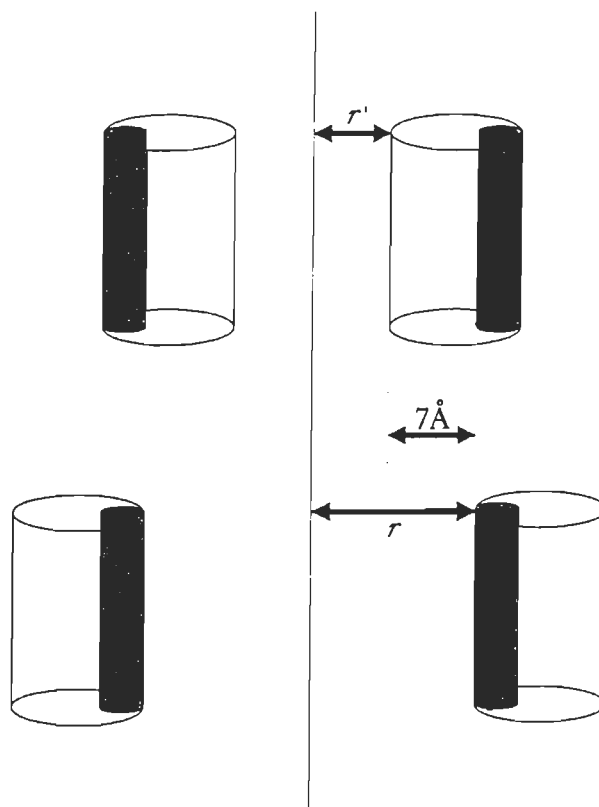


Figure 44. Schéma du rapport entre les rayons de deux pores : hydrophile (r') et hydrophobe (r)

À la lumière de l'hypothèse présentée, le nombre le plus probable de molécules d'AmB dans l'agrégat est $N = 5$ parce que ce système, avec sa valeur de $r' = 4,58 \text{ Å}$, est celui qui correspond le mieux à la valeur de $r' = 4,48 \text{ Å}$ déjà déterminée pour le pore hydrophile dans un milieu lipidique (Andreoli T.E. 1974; Bonilla-Marin *et al.* 1991; De Kruijff *et al.* 1974; El-Sufi *et al.* 1991).

On peut tirer la conclusion suivante :

L'oligomère d'AmB dans un milieu aqueux caractérisé par la bande à 347 nm peut être défini comme un ensemble cylindrique (pore) composé de cinq molécules. Si le spectre montre aussi une bande à 421 nm, l'agrégat d'AmB est

une combinaison dimérique de deux pores (double pore) où chacun contient cinq molécules.

Avec l'augmentation de la concentration d'AmB dans la solution, la structure vibrationnelle des monomères disparaît et la bande à 421 nm devient plus importante. Donc, dans ce cas, la structure de double pore est en expansion.

4.4.2.2 Deuxième agrégat

À la base des données spectroscopiques d'absorption UV-VIS et de DC, il est clair que les agrégats d'AmB qui absorbent à 347 nm ne constituent pas la seule possibilité d'organisation des molécules d'AmB en solution aqueuse. Les spectres de l'AmB dans l'eau montrent sur la bande principale située à 347 nm un épaulement de plus courte longueur d'onde. Cet épaulement correspond à la bande principale d'absorption à 328 nm bien visible sur les spectres des solutions aqueuses de :

- la Fungizone,
- l'AmB dans le *n*-propanol 5%,
- l'AmB en présence du surfactant Hecameg (Figure 45).

Une étude récente parle aussi d'une association oligomérique des molécules d'AmB dans l'eau, représentée sur le spectre par la bande au maximum à 328 nm (Balakrishnan *et al.* 1993).

En appliquant à cette nouvelle espèce la même théorie des excitons et le même procédé de calculs, nous avons obtenu les résultats présentés au Tableau9.

Dans ce cas, on voit que, dans le but d'obtenir des résultats physiques significatifs, il faut assumer une plus petite distance d entre les moments de

transition des chromophores des molécules d'AmB que dans le premier agrégat, celui dont le maximum est situé à 347 nm.

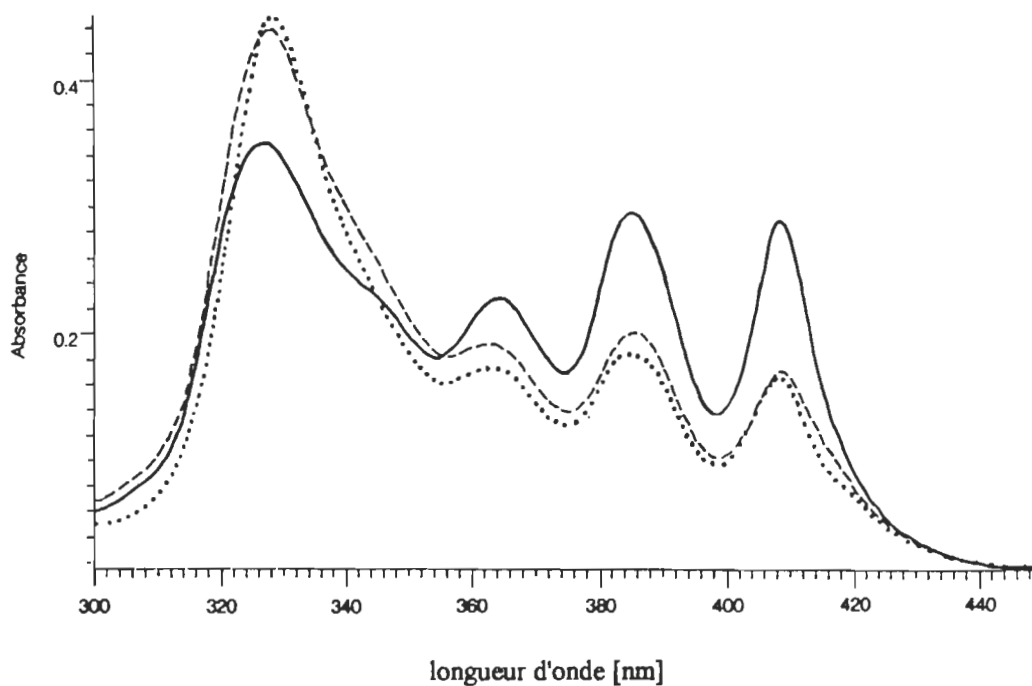


Figure 45. Spectres de l'AmB ($6,5 \times 10^{-6}$ M) dans la solution de Fungizone (···), en présence de *n*-propanol 5% (---), en présence du Hecameg (—)

Tableau 9

Résultats des calculs des paramètres d , r , r' pour l'agrégat d'AmB avec maximum d'absorbance à 328 nm

N	d [Å]	α [deg]	r [Å]	r' [Å]
4	11,89	90	8,41	1,41
5	12,15	72	10,33	3,33
6	12,32	60	12,32	5,32
7	12,43	51,4	14,32	7,32
10	12,64	36	20,45	13,45
∞	13,12	-	-	-

La distance maximale obtenue pour le nombre de molécules en interaction $N = \infty$ est de 13,12 Å, ce qui est plus petit que les valeurs de distance calculées pour l'agrégat qui absorbe à 347 nm. Le Tableau 9 montre les distances d obtenues pour la série de N .

Quelle combinaison est la plus probable?

S'il est vrai que l'incorporation dans les membranes est un phénomène qui comprend l'inversion du pore hydrophobe en pore hydrophile, il faut choisir les résultats qui sont en accord avec ceux calculés pour le pore membranaire hydrophile. Cela veut dire que le rayon $r' = r - 7$ Å devrait être de même ordre que le plus probable rayon des pores hydrophiles, c'est-à-dire de 4,47 à 5 Å. D'après le Tableau 9, le plus proche résultat obtenu est le pore contenant six molécules et un rayon après l'inversion de 5,32 Å. Cependant, le pore constitué de sept ou de huit molécules est aussi probable. Dans les différents travaux, le nombre de monomères constituant un pore se situe entre 4 et 12 molécules (Gruda *et al.* 1988b; Cass *et al.* 1970; Hoogevest *et al.* 1978; Moreno-Bello *et al.* 1988).

Ces derniers résultats signalent que le *n*-propanol et quelques surfactants réagissent avec les agrégats d'AmB d'une telle façon qu'ils serrent les monomères à l'intérieur de la structure agrégée. Il n'est pas facile de s'imaginer pourquoi cela a lieu, mais c'est la conséquence logique de l'application de la théorie des excitons de Kasha généralement acceptée pour des systèmes semblables aux nôtres (Gargiulo *et al.* 1991; Milon *et al.* 1986; Salares *et al.* 1977; Shimomura *et al.* 1983; Tomioka *et al.* 1991).

Cependant, quand on examine attentivement la structure de la molécule d'AmB, il est clair que la partie du sucre aminé limite stériquement le rapprochement des chaînes polyéniques de deux molécules. Il est possible que le

n-propanol remplace des molécules d'eau qui hydratent cette partie de la molécule d'AmB (Berges *et al.* 1990) et ce changement de configuration rend possible une meilleure interaction intermoléculaire. Un phénomène similaire a été observé dans le cas de la chlorophylle agrégée (Chapados C. 1988).

4.4.3 Discussion

De nombreuses études ont été effectuées dans le but de mieux connaître la structure des agrégats de l'AmB (Ernst *et al.* 1981; Hemenger *et al.* 1983; Mazerski *et al.* 1982 et 1990; Rinnert *et al.* 1977). Il a été déterminé que les grands agrégats de 400 à 2000 molécules d'AmB se forment dans des solutions aqueuses concentrées ($\sim 10^{-5}$ M) de la Fungizone (Ernst *et al.* 1981). Voici un rappel de quelques hypothèses portant sur la structure de la forme agrégée de l'AmB.

D'après l'hypothèse de Hemenger (Hemenger *et al.* 1983) les grands agrégats d'AmB dans l'eau ont une structure d'hélice où l'unité qui se répète est un dimère formé de deux molécules d'AmB liées sur le même plan par leur segments-chromophores parallèles ($\uparrow\downarrow$). Ces dimères sont disposés le long de l'axe d'hélice la translation répétée de l'angle de 47° . L'hypothèse des dimères a été adoptée par d'autres chercheurs (Bolard *et al.* 1991)

En se basant sur les résultats obtenus par la RMN et plus précisément par la méthode de NOE (Nuclear Overhauser Effect), une étude très récente appuie aussi le modèle de dimère où les molécules sont en position de "tête-à-queue", parallèles et placées les unes à côté des autres (Balakrishnan *et al.* 1993). Les auteurs démontrent les couplages entre les protons situés à un bout d'une molécule et les protons situés à l'autre bout d'une seconde molécule d'AmB,

comme par exemple entre le proton 6' du groupe méthyle d'une partie de sucre et le proton du groupe hydroxyle lié à C35 (Figure 46).

L'interprétation des résultats de ces couplages peut conduire aussi bien à un dimère du type (b) qu'à un dimère du type (c) (Figure 46). Ces résultats renforcent donc notre modèle du double pore hydrophobe où les molécules d'AmB se trouvent en position (c).

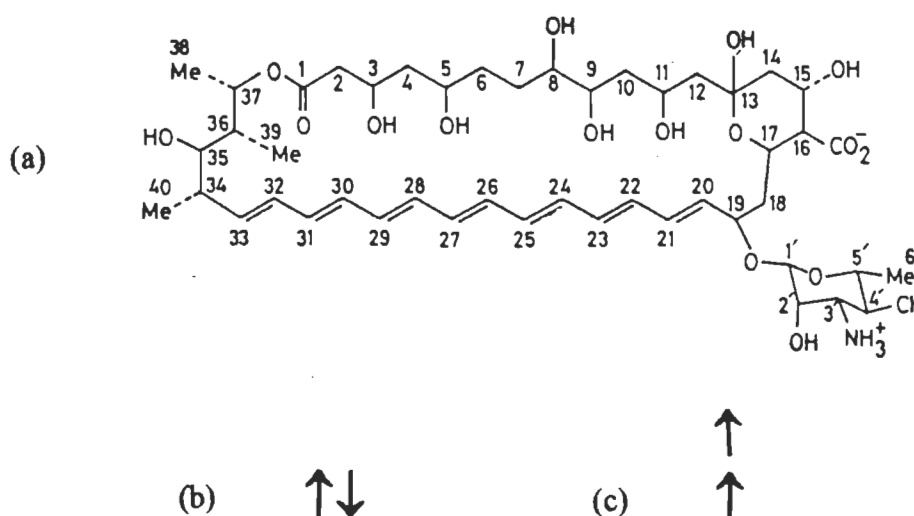


Figure 46. Structure moléculaire de l'AmB (a) et schéma de deux positions (b) et (c) des molécules en formation "tête-à-queue" donnant deux sortes des dimères

Il existe aussi une hypothèse selon laquelle les molécules en s'associant forment des trimères (Mazerski *et al.* 1982).

Dans un autre travail (De Kruijff B. 1990) on parle de la formation d'agrégats avec intérieur hydrophobe au-dessus de la CMC de l'AmB dans l'eau, mais aucune structure exacte pour ces formes n'est proposée. En se basant sur l'existence de la CMC pour l'AmB, sa forme autoassociée est appelée "micelle" aussi bien dans un milieu aqueux que dans des solvants hydrophobes qui ne

solubilisent pas l'AmB (Lematre *et al.* 1977). La forme des micelles de l'antibiotique n'est pas précisée, la structure des pores membranaires est traitée comme une organisation de molécules tout à fait différente de celle des micelles.

Le déplacement de la bande principale du spectre d'AmB vers l'ultraviolet, la disparition de la structure vibrationnelle du spectre du polyène-monomère et la présence du doublet dichroïque sont attribuées à l'oligomérisation plutôt qu'à l'agrégation (Mazerski *et al.* 1982). Donc, l'agrégat est un ensemble d'oligomères. La grandeur de l'agrégat de l'AmB dépend de la concentration de l'antibiotique et de sa pureté; sa forme semble être non sphérique (Lamy-Freund *et al.* 1993).

Nous avons montré qu'une autre approche donne une bonne approximation en utilisant la structure du pore comme base des modifications spectrales. Notre approche est fondée sur la théorie des excitons, bien connue et utilisée dans de nombreux cas pour prédire l'arrangement moléculaire dans les agrégats de différents chromophores (Gruszecki W.I. 1992; Milon *et al.* 1986; Shimomura *et al.* 1983; Tomioka *et al.* 1991). Dans le cas de l'AmB, l'interaction excitonique est bien établie à la base des spectres de DC (Rinnert *et al.* 1977) et de UV-VIS, donc la théorie mentionnée peut être appliquée.

Mais la question se pose: comment peut-on expliquer le très fort doublet dichroïque caractéristique pour l'oligomère de l'AmB par la structure proposée du pore qui semble être parfaitement symétrique?

L'asymétrie qui est à la base du signal de dichroïsme circulaire peut être introduite dans notre modèle de différentes manières :

- Les chromophores peuvent être légèrement penchés par rapport à l'axe du pore. Le petit angle ($<5^\circ$) ne change pas les résultats de nos calculs, mais introduit une asymétrie constante et répétitive dans le système. Ce type

d'orientation moléculaire a été proposé récemment pour les canaux formés par les molécules d'AmB seule ou associée avec les molécules de stérol dans les membranes lipidiques (Khutorsky V.E. 1992a).

- L'asymétrie constante peut être causée par le "twisting" du chromophore polyénique au cours de l'agrégation. Ce "twisting" peut résulter d'un empêchement stérique créé par le groupement volumineux du sucre aminé présent dans la molécule d'AmB.
- Les modèles simples des polyènes linéaires proposent une orientation parallèle du moment de transition à l'axe de la molécule, ce que nous avons assumé dans notre modèle. Cependant, la possibilité d'orientation non parallèle du moment de transition électronique à l'axe moléculaire n'est pas à exclure (Shang *et al.* 1991).

Il n'est pas possible de juger quelle situation prévaut dans le cas des oligomères d'AmB dans l'eau, mais la géométrie de base du système reste toujours la même : le pore hydrophobe cylindrique au rayon donné.

Quel est le mécanisme d'interaction de l'AmB avec la membrane cellulaire?

Quel est le mécanisme de formation des pores membranaires?

Tous les chercheurs sont d'accord à l'effet que les pores sont à la base du mécanisme de l'activité anticellulaire de l'AmB.

De nombreux travaux ont contribué à l'avancement de la compréhension de l'arrangement moléculaire de l'AmB dans la membrane cellulaire (Andreoli T.E. 1974; De Kruijff *et al.* 1974a; Ganis *et al.* 1971; Finkelstein *et al.* 1973). D'après certains auteurs, l'extrémité de l'AmB n'est pas en mesure de s'insérer dans la bicouche lipidique. Les groupes hydroxyles longeant un côté de la molécule imposent aussi une contrainte thermodynamique à chaque forme d'insertion dans

la membrane. Les auteurs cités suggèrent donc que l'AmB s'associe avec le stérol et forme des pores hydrophiles transmembranaires. Plus précisément, la forme monomérique d'AmB s'associe à la membrane de telle sorte que sa partie hydrophile riche en oxygène et sans charge, et sa tête polaire chargée, sont dirigées vers la phase aqueuse. Sans stérol dans la membrane, il ne se passe plus rien. Le stérol avec sa structure rigide et plate est capable de stabiliser la topologie de la molécule d'AmB de manière à ce que son grand axe s'oriente perpendiculairement à la surface de la membrane. Évidemment, si seulement une molécule est impliquée, cette orientation n'est pas stable énergétiquement. Donc, la fonction principale de la molécule de stérol dans ce mécanisme est d'abaisser la barrière d'énergie pour l'orientation de la molécule de l'AmB parallèlement à la normale de la membrane.

D'autres auteurs (Urbina *et al.* 1987) proposent que l'interaction initiale de l'AmB avec les membranes contenant l'ergostérol résulte de l'insertion et d'un réarrangement consécutif des oligomères d'AmB. Donc, même à une faible concentration d'AmB c'est la forme agrégée qui réagit avec la membrane (Julien *et al.* 1990).

Au cours d'études avec les modèles membranaires, deux types de pores de diamètre différent ont été observés (Cohen B.E. 1992) :

- les pores qui peuvent se former sans l'aide du stérol, nommés "non aqueux", dont l'apparition se caractérise par une augmentation de la perméabilité à l'urée sans que soit augmentée celle au glucose;
- les pores nommés "aqueux".

L'auteur a formulé une hypothèse selon laquelle le processus débute par la formation des pores non aqueux qui réagissent ensuite avec les stérols de la membrane formant les pores aqueux au diamètre plus grand.

D'autres (Bonilla-Marin *et al.* 1991) développent un modèle électrostatique pour les deux types de pores formés par l'AmB, en considérant la possibilité d'une variation du nombre d'unités du complexe AmB-stérol et d'une variation du rayon du pore pour le même nombre d'unités. Les profils électrostatiques obtenus renforcent l'hypothèse de l'existence des pores formés par un nombre variable de molécules d'AmB, où la barrière électrostatique pour le passage des ions diminue avec l'augmentation du rayon de pore, ce qui provoque l'augmentation de la perméabilité de la membrane et, en conséquence, l'augmentation de la toxicité.

Les résultats de ces études prouvent l'existence de deux types de pores, ce qui peut être interprété, selon notre modèle, comme deux structures oligomériques de l'AmB dans l'eau, une qui absorbe à 347 nm et l'autre au rayon plus grand, qui absorbe à 328 nm.

Néanmoins, la formation et même l'existence du double pore dans la membrane ne sont pas prouvées.

Le concept de l'organisation spontanée des molécules d'AmB dans l'environnement aqueux avec l'incorporation et l'inversion consécutive à l'intérieur de la membrane est en mesure d'expliquer la toxicité inhabituelle du médicament appliqué sous la forme de dispersion aqueuse. Il est très probable que les pores hydrophobes présents dans le milieu réagissent plus facilement que les monomères avec la membrane, et forment après l'inversion des pores membranaires prêts à agir qui affectent radicalement la perméabilité membranaire et le phénomène du transport à travers la bicouche.

L'inversion vers la direction opposée, comme la transformation des micelles inversées formées par les molécules d'AmB dans un solvant organique, en micelles normales quand des gouttes d'eau sont ajoutées à la solution, est déclaré

comme étant un processus spontané (Lematre *et al.* 1977). D'après notre hypothèse, les micelles d'AmB dans l'eau ont la structure des pores hydrophobes, et les micelles inversées, des pores hydrophiles. Ces pores sont aussi les plus petites formes agrégées de l'AmB, stables et bien définis, donc les oligomères. Dans l'eau, ils forment facilement de grands agrégats par l'agglomération de type "tête-à-queue" et de type "côte-à-côte", où les pores possédant à l'extérieur de nombreux groupes hydroxyles se lient probablement par l'intermédiaire de molécules d'eau en formant des liaisons hydrogènes. Ces liaisons faibles sont à l'origine du manque de stabilité thermique des agrégats. Il est clair que la forme des agrégats construits d'une telle façon n'est peut pas être sphérique. Un aperçu de cette situation est présenté sur la Figure 47.

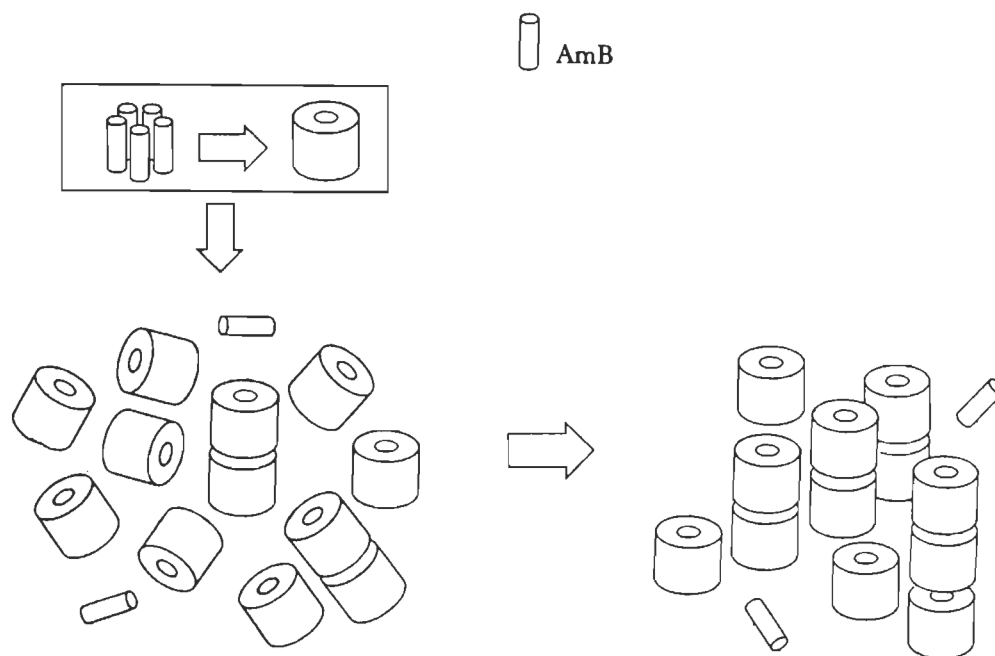


Figure 47. Schéma d'aggrégation des oligomères d'AmB dans l'eau. Chaque oligomère (le pore) est représenté sous forme d'un simple cylindre

Nous avons déjà observé l'amélioration de la sélectivité de l'AmB *in vitro* (chapitres 4.1 et 4.2) et la diminution de sa toxicité chez les souris (chapitre 4.3), causées par la désintégration des agrégats et des oligomères de l'antibiotique par les surfactants. Pour cette raison, le mécanisme ci-haut proposé de l'interaction des agrégats de l'AmB avec la membrane cellulaire, nous semble très probable. D'ailleurs, la structure proposée pour les agrégats d'AmB conduit à une meilleure compréhension de la plus grande toxicité des solutions contenant l'AmB agrégée que celle des solutions où l'antibiotique est sous une forme monomérique.

5. CONCLUSIONS

Les résultats de cette recherche permettent une meilleure compréhension du mécanisme de l'activité biologique de l'AmB et une planification des stratégies nouvelles pour la diminution de la toxicité de la thérapie antifongique.

Les observations physicochimiques et biologiques concordent bien et montrent clairement que la toxicité et l'activité sélective de l'AmB peuvent être modulées par la modification de l'état physique de l'antibiotique, l'utilisation de surfactants étant une des méthodes possibles pour obtenir l'état d'agrégation optimal.

Le modèle de pore proposé dans ce travail pour les structures d'AmB dans l'eau permet de mieux visualiser et de comprendre les raisons de la plus grande toxicité des certaines formulations d'AmB. Ce modèle constitue ainsi un élément intégrateur entre les résultats obtenus *in vitro* et ceux obtenus sur les animaux. L'existence des pores et de doubles pores ainsi que de deux diamètres de pores dans l'eau et dans la membrane explique bien la plus grande toxicité de la Fungizone par rapport aux formulations presque monomériques de l'AmB avec le LS ou avec le DOC. Ces observations et le fait que la sélectivité de l'antibiotique est fortement liée à son état d'agrégation, suggèrent que l'activité sélective de l'AmB est la plus élevée quand l'antibiotique se trouve sous forme monomérique. Un milieu qui cause la monomérisation de l'AmB devrait aussi servir comme protecteur contre une oxydation de l'antibiotique et contre une interaction avec le cholestérol situé dans les membranes cellulaires des mammifères et facilement accessible dans les lipoprotéines plasmatiques.

Selon notre modèle les structures les plus cytotoxiques sont en même temps les moins sélectives. Il est frappant que ce fait concorde parfaitement avec la théorie de la réactivité sélective des composés chimiques (Jones R.A.Y. 1984). Dans notre cas l'augmentation de la sélectivité correspond à la disparition en premier lieu des agrégats pour lesquels nous proposons la structure du double pore et qui seraient donc les plus toxiques. L'augmentation de la sélectivité d'interaction de l'AmB avec les deux stérols (ergostérol et cholestérol) coïncide avec la diminution de la réactivité de l'antibiotique, diminution due au changement de l'état d'agrégation, c'est-à-dire à la disparition des grands agrégats (des doubles pores) et à la monomérisation de l'AmB. On peut raisonnablement croire que chaque moyen diminuant la réactivité de l'AmB envers les stérols apportera une augmentation de sa sélectivité.

En résumé, en présence des doubles pores on n'observe pas la sélectivité de l'AmB et la toxicité est grande, la destruction de doubles pores amène une augmentation de la sélectivité, la destruction des pores simples abaisse l'activité cellulaire, c'est-à-dire la plus grande affinité de l'AmB envers l'ergostérol qu'envers le cholestérol commence à jouer un rôle, la sélectivité s'approchant de sa valeur maximale. C'est alors que la toxicité du médicament pour les animaux diminue et que, pour être en mesure de dire que l'antibiotique est toujours biologiquement actif, il est nécessaire de faire des expériences sur des animaux infectés.

Un autre élément important apporté au cours de ce travail est la relation entre la toxicité de différentes formulations d'AmB et l'interaction de cette dernière avec les lipoprotéines. Il est clair que la liaison AmB-lipoprotéines est toxique pour l'organisme humain. Sans savoir quelle est la raison de cette toxicité on peut s'imaginer que les mêmes facteurs qui diminuent la réaction de

l'AmB avec la membrane cellulaire des mammifères diminuent aussi la réaction de l'AmB avec les lipoprotéines. La recherche menée dans cette direction semble avoir un grand potentiel.

En résumé, les conclusions de ce travail sont les suivantes:

- Les résultats de cette recherche nous permettent une meilleure compréhension du mécanisme de l'effet d'une série des surfactants sur la toxicité sélective de l'AmB.
- Une corrélation entre l'effet des surfactants sur l'état d'agrégation de l'AmB et son activité *in vitro* et *in vivo* a été établie.
Cela permet de confirmer l'hypothèse de l'influence de l'état physique de l'AmB sur sa toxicité sélective.
- Une relation entre la diminution de la toxicité aiguë de l'AmB par différents additifs et l'interaction AmB-lipoprotéines du sang, a été démontrée.
Jusqu'à présent, la réaction de l'AmB avec les lipoprotéines plasmatiques a été jugée comme étant un phénomène protecteur pour les érythrocytes et pour la membrane cellulaire. Au contraire, selon notre hypothèse, c'est justement la liaison AmB-lipoprotéines qui est toxique pour l'organisme humain.
- Le modèle proposé de structures agrégées de l'AmB en milieu aqueux peut être utilisé pour l'étude de la toxicité du médicament et peut constituer un élément intégrateur dans une interprétation homogène des résultats de recherches de différents auteurs.

- La valeur des résultats de cette étude pour des applications pratiques consiste en ce qu'ils permettent de préciser les conditions de préparation de solutions d'AmB moins toxiques.
- Les résultats obtenus indiquent la pertinence de la continuation de cette recherche et permettent de formuler à cet effet les suggestions suivantes :
 - étudier l'effet de l'état d'agrégation de l'AmB en présence de surfactants sur l'efficacité thérapeutique de l'antibiotique;
 - étudier davantage l'interaction AmB-stérols;
 - étudier l'interaction AmB-lipoprotéines, son mécanisme et ses conséquences;
 - étudier l'effet de la modification de l'état d'agrégation de l'AmB par des surfactants sur la perméabilité et sur l'intégrité de membranes cellulaires naturelles et artificielles;
 - étudier l'effet des surfactants sur l'état d'agrégation des dérivés de l'AmB qui se caractérisent par une meilleure solubilité dans l'eau.

BIBLIOGRAPHIE

Ahmed I., Sarkar A.K. & Bachhawat B.K. (1990). Effect of cholesterol in various liposomal compositions on the in vivo toxicity, therapeutic efficacy and tissue distribution of amphotericin B. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **12** ; 550-556.

Ahrens J., Graybill J.R., Craven P.C. & Taylor R.L. (1984). Treatment of experimental murine candidiasis with liposome-associated amphotericin B. *Sabouraudia*, **22** : 163-166.

Andreoli T.E. (1974). The structure and function of amphotericin B-cholesterol pores in lipid bilayer membranes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **235** : 448-468.

Aoudia M., Wade W.H. & Rodgers M.A.J. (1991). Excimer-monomer emission in alkylbenzenesulfonate dispersions : effect of the surfactant structure on aggregation. *J. Colloid and Interface Sci.* **145** : 493-501.

Aracava Y., Schreier S., Phadke R., Deslauriers R. & Smith I.C.P. (1981a). Spin labeled reduction kinetics, a procedure to study the effect of drugs on membrane permeability : the effects of monosodium urate dimethyl sulfoxide and amphotericin B. *Biochem. Biophys. Methods*, **5** : 83-94.

Aracava Y., Smith I.C.P. & Schreier S. (1981b). Effect of amphotericin B on membranes: a spin probe study. *Biochem.* **20** : 5702- 5707.

Attwood D. & Florence A.T. (1983). *Surfactant Systems : Their Chemistry, Pharmacy, and Biology*, Chapman and Hall, London, pp. 794.

Baginski M., Tempczyk A. & Borowski E. (1989). Comparative conformational analysis of cholesterol and ergosterol by molecular mechanics. *Eur. Biophys. J.* **17** : 159-166.

Balakrishnan A.R. & Easwaran K.R.K. (1993). CD and NMR studies on the aggregation of amphotericin-B. *Biochim. Biophys. Acta*, **1148** : 269-277.

Barbeau N. (1990). *Effets du dodecyl sulfate de sodium sur l'etat d'agrégation de l'amphotéricine B et sur la formation de complexes entre l'amphotéricine B et les stérols*, projet de fin d'étude, Université du Québec à Trois-Rivières.

Beggs W.H., Sarosi G.A. & Steele N.M. (1976). Inhibition of potentially pathogenic yeast like fungi by clotrimazole in combination with 5-fluorocytosine or amphotericin B. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **9** : 863-865.

Berges J., Caillet J., Langlet J., Gresh N., Hervé M. & Gary-Bobo C. (1990). Conformational study of the polar head of the amphotericin B in the isolated state and in the presence of water molecules. *Studies in Physical and Theoretical Chemistry*, **71** : 253-263.

Bittman R. & Fischkoff S.A. (1972). Fluorescence studies of the binding of the polyene antibiotics filipin III, amphotericin B, nystatin and lagosin to cholesterol. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69** : 3795-3799.

Blanke T.J., Little J.R., Shirley S.F. & Lynch R.G. (1977). Augmentation of murine immune responses by amphotericin B. *Cell. Immunol.*, **33** : 180-190.

Bodey G.P. (1977). Infections complications in cancer patients. *Curr. Probl. Cancer*, **1** : 1-63

Bolard J. (1986). How do the polyene macrolide antibiotic affect the cellular membrane properties?, *Biochim. Biophys. Acta*, **864** : 297-304.

Bolard J. & Cheron M. (1982). Association of the polyene antibiotic amphotericin B with phospholipid vesicles : perturbation by temperature changes. *Can. J. Biochem.* **60** : 782- 789.

Bolard J., Legrand P., Heitz F. & Cybulska B. (1991). One-sided action of amphotericin B on cholesterol-containing membranes is determined by its self-association in the medium. *Biochemistry*, **30** : 5707-5715.

Bolard J., Seigneuret M. & Boudet G. (1980). Interaction between phospholipid bilayer membranes and the polyene antibiotic amphotericine B. Lipid state and cholesterol content dependence. *Biochim. Biophys. Acta*, **599** : 280-293.

Bonilla-Marin M., Moreno-Bello M. & Ortega-Blake I. (1991). A microscopic electrostatic model for the amphotericin B channel. *Biochim. Biophys. Acta*, **1061** : 65-77.

Borisowa M.P. & Kasumow K.M. (1978). Sterol structure-dependent properties of amphotericin B channels. *Studia Biophys.* **71** : 197-202.

Brajtburg J., Elberg S., Bolard J., Kobayashi G.S., Levy R.A., Ostlund R.E.Jr., Schlessinger D. & Medoff G. (1984). Interaction of plasma proteins and lipoproteins with amphotericin B. *J. Infect. Dis.* **149** : 986-997.

Brajtburg J., Elberg S., Kobayashi G.S. & Medoff G. (1986). Toxicity and induction of resistance to listeria monocytogenes infection by amphotericin B in inbred strains of mice. *Infect. Immun.* **54** : 303-307.

Brajtburg J., Kobayashi D., Medoff G. & Kobayashi G.S. (1982). Antifungal action of amphotericin B in combination with other polyene or imidazole antibiotics. *Infect. Dis.* **146** : 138-145.

Brajtburg J., Gruda I., Daigle I. & Medoff G. (1989). Concentration dependent dual effect of the monolaurylester of sucrose on the antifungal activity and absorption spectra of amphotericine B (Fungizone), *Biochim. Biophys. Acta*, **985** : 307-312.

Brochure " Ryoto Sugar Ester; Technical Information" Mitsubishi-Kasei Food Corporation, Tokyo, Japon.

Bustamante C., Tinoco I .Jr. & Maestre M.F. (1983). Circular differential scattering can be an important part of the circular dichroism of macromolecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80** : 3568-3572.

Caillot D., Casasnovas O., Solary E., Chavanet P., Bonnotte B., Reny G., Entezam F., Lopez J., Bonnin A. & Guy H. (1993). Efficacy and tolerance of an amphotericin B lipid (Intralipid) emulsion in the treatment of candidaemia in neutropenic patients. *J. Antimicrob. Chemother.* **31** : 161-169.

Cass A., Finkelstein A. & Krespi V. (1970). The ion permeability induced in thin lipid membranes by the polyene and antibiotics nystatin and amphotericin B. *J. Gen. Physiol.* **56** : 100-105.

Capuozzo E. & Bolard J. (1985). Interaction of the polyene antibiotic etruscomycin with large unilamellar lipid vesicles : binding and proton permeability inducement. *Biochim. Biophys. Acta*, **820** : 63-73.

Chapados C. (1988). Aggregation of chlorophyll α species absorbing near 700 nm. 1. The infrared carbonyl bands. *Photochem. Photobiol.* **47** : 115-132.

Chéron M. & Bolard J. (1981). Incorporation de la (3R,3R') zéaxanthine dans des vésicules de dipalmitoyle phosphatidylcholine. Analyse par dichroïsme circulaire. *C. R. Acad. Sc. Paris*, **292** : 1125-1128.

Chéron M., Cybulska B., Mazerski J., Grzybowska J., Czerwinski A. & Borowski E. (1988). Quantitative structure-activity relationships in amphotericin B derivatives. *Biochem. Pharmacol.*, **37** : 827-836.

Chen W. & Bittman R. (1977). Kinetics of association of amphotericin B with vesicles. *Biochemistry*, **16** : 4145-4149.

Chopra R., Blair S., Strang J., Patterson K.G. & Goldstone A.H. (1991). Liposomal amphotericin B (AmBisome) in the treatment of fungal infections in neutropenic patients. *J. Antimicrob. Chemother.* **28** : 93-104.

Clark J.M., Whitney R.R., Olsen S.J., George R.J., Swerdel M.R., Kunselman L. & Bonner D.P. (1991). Amphotericin B lipid complex therapy of experimental fungal infections in mice. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **35** : 615-622.

Clejan S. & Bittman R. (1985). Rates of amphotericin B and filipin association with sterols. A study of changes in sterol structure and phospholipid composition of vesicles. *J. Biol. Chem.* **260** : 2884-2889.

Clemons K.V. & Stevens D.A. (1991a). Comparative efficacy of amphotericin B colloidal dispersion and amphotericin B deoxycholate suspension in treatment of murine coccidioidomycosis. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **35** : 1829-1833.

Clemons K.V. & Stevens D.A. (1991b). Comparative efficacies of amphotericin B lipid complex and amphotericin B deoxycholate suspension against murine blastomycosis. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **35** : 2144-2146.

Cohen B.E. (1986). Concentration- and time-dependence of amphotericin B induced permeability changes across ergosterol-containing liposomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **857** : 117-122.

Cohen B.E. (1992). A sequential mechanism for the formation of aqueous channels by amphotericin B in liposomes. The effect of sterols and phospholipid composition. *Biochim. Biophys. Acta*, **1108** : 49-58.

Cohen B.E. & Gamargo M. (1987). Concentration and time dependence of amphotericin B-induced permeability changes across plasma membrane vesicles from *Leishmania* sp. *Drugs Exptl. Clin. Res.* **13** : 539-546.

Coune A. (1988). Amphotericin B as a potentiation agent to cytotoxic chemotherapy. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* **24** : 117-121.

Czerwinski A., Konig W.A., Sowinski P., Falkowski L., Mazerski J. & Borowski E. (1990). Amphotericin B O-methyl oxime. Synthesis and biological properties. *J. Antibiot. (Tokyo, Japon)*, **43** : 1098-1100.

Czerwinski A., Konig W.A., Zieniawa T., Sowinski P., Sinnwell V., Milewski S. & Borowski E. (1991). New n-alkyl derivatives of amphotericin B and biological properties. *J. Antibiotics*, **44** : 979- 984.

Davydov A.S. (traduit par Kasha M. & Oppenheimer M.Jr.) (1962). *Theory of Molecular Excitons*. McGraw-Hill, New York.

Davis S.S., Washington C. & West P. (1987). Lipid emulsions as drug delivery systems. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **507** : 75-88.

De Kruijff B. (1990). Cholesterol as a target for toxins. *Bioscience Reports*, **10** : 127-130.

De Kruijff B. & Demel R.A. (1974a). Polyene antibiotic-sterol interaction in membranes of *Acholeplasma Laidlawii* cells and lecithin liposomes; III Molecular structure of the polyene antibiotic-cholesterol complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, **339** : 57-70.

De Kruijff B., Gerritsen W.J., Oerlemans A., Demel R.A. & Van Deenen L.L.M. (1974b), Polyene antibiotic-sterol interaction in membranes of *Acholeplasma Laidlawii* cells and lecithin liposomes. 1. Specificity of the membrane permeability changes induced by the polyene antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta* **339** : 30-43.

De Kruijff B., Gerritsen W.J., Oerlemans A., Van Dijck P.W.M., Demel R.A. & Van Deenen L.L.M. (1974c). Polyene antibiotic-sterol interactions in membranes of *Acholeplasma Laidlawii* cells and lecithin liposomes. 2. Temperature dependence of the polyene antibiotic-sterol complex formation. *Biochim. Biophys. Acta*, **339** : 44-56.

Desnoyers J.E. (1989). Why measure thermodynamic properties of micellar systems?, *J. Surface Sci. Technol.* **5** : 289-308.

Drouhet E. (1970) Traitement of the systemic mycoses. Dans : *Modern Therapy* (Ed. Utz J.P.) Harper & Row, New York, pp. 539-564.

Dufourc E.J., Smith I.C.P. & Jarrell H.C. (1984). Amphotericin B and model membranes. The effect of Amphotericin B on cholesterol containing systems as viewed by ^2H -NMR. *Biochim. Biophys. Acta*, **776** : 317-329.

Edmonds L.C., Davidson L. & Bertino J.S.Jr. (1989). Solubility and stability of amphotericin B in human serum. *Ther. Drug Monit.* **11** : 323-326.

Edwards J.E.Jr. moderator, Lehrer R.R.J., Stiehm E.R., Fisher T.J. & Young L.S. discussants (1978). Severe candidal infections. Clinical perspective, immune defense mechanism, and current concepts of therapy. *Ann. Intern. Med.* **89** : 91-106

Ellis W.G., Bencken E., Le Couteur R.A., Barbano J.R., Wolfe B.M. & Jennings M.B. (1988). Neurotoxicity of amphotericin B methyl ester in dogs. *Toxicol. Pathol.* **16** : 1-9.

El-Sufi A.F., Sabirov R.Z., Krasil'nikov O.V. & Tashmukhamedov B.A. (1991). Measurement of amphotericin pores in erythrocyte membranes. *Doklady Akademii Nauk SSSR*, **317** : 480-481.

Ermishkin L.N., Kasumov Kh.M. & Potseluyev V.M. (1977). Properties of amphotericin B channels in a lipid bilayer. *Biochim. Biophys. Acta*, **470** : 355-367.

Ernst C., Grange J., Rinnert H., Dupont G. & Lematre J. (1981). Structure of Amphotericin B aggregates as revealed by UV and CD spectroscopies. *Biopolymers*, **20** : 1575-1588.

Ernst C., Lematre J., Rinnert H., Dupont G. & Grange J. (1979). Interaction d'un heptaène antifongique, l'Amphotéricine B, avec le cholestérol in vitro, détectée par dichroïsme circulaire et absorption. Influence de la température. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **289** : 1145-1148.

Ernst R. & Arditto J. (1980). Biological effects of surfactants. IV. Effects of nonionics and amphoterics on Hela cells. *Toxicology*, **15** : 233-242.

Fielding R.M. (1991). Liposomal drug delivery : advantages and limitations from a clinical pharmacokinetic and therapeutic perspective. *Clinical Pharmacokinetics*, **21** : 155-164.

Finkelstein A. & Holz R. (1973). Dans : *Membranes, Lipid Bilayers and Antibiotics* (Ed.: Eisenman G.), Marcel Dekker, New York, pp. 377-408.

Fourcans B. & Juin M.K. (1974). Role of phospholipids in transport and enzymic reactions. *Advances in Lipid Research*, **12** : 147-226.

Ganis P., Avitabile G., Mechlinski W. & Schaffner C.P. (1971). Polyene macrolide antibiotic Amphotericin B. Crystal structure of the N-Iodoacetyl derivative. *J. Amer. Chem. Soc.* **93** : 4560-4564.

Gargiulo D., Derguini F., Berova N., Nakanishi K. & Harada N. (1991). Unique ultraviolet-visible and circular dichroism behavior due to exciton coupling in a biscyanine dye. *J. Am. Chem. Soc.* **113** : 7046-7047.

Gary-Bobo C.M. (1989). Polyene-sterol interaction and selective toxicity. *Biochimie*, **71**: 37-47.

Gent M.P.N. & Prestegard J.H. (1976). Interaction of the polyene antibiotics with lipid bilayer vesicles containing cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta*, **426** : 17-30.

Gold W., Stout H.A, Pagano J.F. & Donovan R. (1956) Amphotericin A and B, antifungal antibiotics produced by a streptomycete. *Antibiotics Ann.* **1955-1956** : 579-586.

Gouw T.H. (ed). (1976). *Nowoczesne metody instrumentalne analizy*. (traduction polonaise de : Guide to Modern Methods of Instrumental Analysis). W.N.T., Warszawa, pp. 137-170.

Graybill J.R. & Craven P.C. (1983). Antifungal agents used in systemic mycoses activity and therapeutic use. *Drugs*, **25** : 41-62.

Graybill J.R., Craven P.C., Taylor R.L., Williams D.M. & Magee W.E. (1982). Treatment of murine cryptococcosis with liposome-associated amphotericin B. *J. Infect. Dis.*, **145** : 748-752.

Gruda I. & Dussault N. (1988a). Effect of the aggregation state of amphotericin B on its interaction with ergosterol. *Biochem. Cell Biol.* **66** : 177-183.

Gruda I., Gauthier E., Elberg S., Brajtburg J. & Medoff G. (1988b). Effects of the detergent sucrose monolaurate on binding of amphotericin B to sterols and its toxicity for cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **154** : 954-958.

Gruda I., Milette D., Brother M., Kobayashi G.S., Medoff G. & Brajtburg J. (1991). Structure-activity study of inhibition of amphotericin B (Fungizone) binding to sterols, toxicity to cells, and lethality to mice by esters of sucrose. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **35** : 24-28.

Gruda I., Nadeau P., Brajtburg J. & Medoff G. (1980). Application of differential spectra in the UV-VIS region to study the formation of amphotericin B-sterol complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, **602** : 260-268.

Gruszecki W.I. (1992). Structural characterization of the aggregated forms of violaxanthin. *J. Biol. Phys.* **18** : 99-109.

Guo L.S.S., Fielding R.M., Lasic D.D., Hamilton R.L. & Mufson D. (1991). Novel antifungal drug delivery : stable amphotericin B-cholesteryl sulfate discs. *Internation. J. Pharmaceutics.* **75** : 45-54.

Hatch F.T. & Lees R.S. (1968). Practical method for plasma lipoprotein analysis. *Adv. Lipid Res.* **6** : 1-68.

Hazen E.L. & Brown R. (1951). Nystatin. *Proc. Soc. Exp. Biol. (N.Y)* **76** : 93.

Helenius A. & Simons K. (1975). Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta*, **415** : 29-79.

Hemenger R.P., Kaplan T. & Gray L.J. (1983). Structure of amphotericin B aggregates based on calculations of optical spectra. *Biopolymers*, **22** : 911-918.

Herrington T.M. & Sahi S.S. (1986). Temperature dependence of the micellar aggregation number of aqueous solution of sucrose monolaurate and sucrose monooleate. *Colloid and Surface*, **17** : 103-113.

Hervé M., Cybulska B. & Gary-Bobo C.M. (1985). Cation permeability induced by valinomycin, gramicidin and amphotericin B in large lipidic unilamellar vesicles studied by phosphorous 31-NMR. *Eur. Biophys. J.* **12** : 121-128.

Hervé M., Debouzy J.C., Borowski E., Cybulska B. & Gary-Bobo C.M. (1989). The role of the carboxyl and amino groups of polyene macrolides in their interaction with sterols and their selective toxicity. A ³¹P-NMR study. *Biochim. Biophys. Acta*, **980** : 261-272.

Hochstrasser R.M. & Kasha M. (1964). Application of the exciton model to monomolecular lamellar systems. *Photochem. Photobiol.* **3** : 317-331.

Hoeprich P.D., Huston A.C. & Wolfe B.M. (1985). Toxicity of amphotericins on chronic administration to mongrel dogs. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **3** : 47-58.

Holz R. & Finkelstein A. (1970). The water and nonelectrolyte permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B. *J. Gen. Physiol.* **56** : 125-131.

Hoogevest V.P. & De Kruijff B. (1978). Effect of amphotericin B on cholesterol-containing liposomes of egg phosphatidylcholine and didocosenoyl phosphatidylcholine. A refinement of the model for the formation of pores by amphotericin B in membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **511** : 397-407.

Hospental D.R. (1989). Development of liposomal amphotericin B bearing anticandidal antibody and use of this preparation on the therapy of murine model of candidiasis. *Dissertation*, Mich. State Univ. USA.

Hsu M.J. & Juliano R.L. (1982). Interaction of liposomes with the reticuloendothelial system. II. Nonspecific and receptor-mediated uptake of liposomes by mouse peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta*, **720** : 411-419.

Iannitelli R.C. & Ikawa M. (1980). Effect of fatty acids on action of polyene antibiotics. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **1980** : 861-864.

Janknegt R., Siem de Marie, Bakker-Woudenberg I.A.J.M. & Crommelin D.J.A. (1992). Liposomal and lipid formulations of amphotericin B. Clinical pharmacokinetics. *Clin. Pharmacokinet.* **23** : 279-291.

Janoff A.S. (1990). Liposomes and lipid structures as carriers of amphotericin B. *Eur. J. Clin. Microbiol. and Infectious Dis.* **9** : 146-151.

Janoff A.S., Boni L.T., Popescu M.C., Minchey S.R., Cullis P.R., Madden T.D., Taraschi T., Gruner S.M., Shyamsunder E., Tae M. W., Mendelsohn M. & Bonner D. (1988). Unusual lipid structure selectivity reduce the toxicity of amphotericin B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85** : 6122-6126.

Joly V., Sait-Julien L., Carbon C. & Yeni P. (1991). In vitro renal toxicity and in vivo therapeutic efficacy in experimental C. neoformans meningoencephalitis of Fungizone associated to Intralipid. Dans : *Program and abstracts of the Thirty-First Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, Il. 1991*. American Society for Microbiology Washington, DC. Abstract 578, p.195.

Jones R.A.Y. (1984). *Physical and Mechanistic Organic Chemistry*. (Eds. : Benkovic S.J., Elmore D.T., Lewis J., Schafeld K., Thomas J.M., Thrush B.A.), Cambridge University Press, second edition.

Jou W.S. & Chun P.W. (1991). Molecular mechanics of the formation of cholic acid micelles. *J. Mol. Graphics*, **9** : 237-240, 243-246.

Juliano R.L., Lopez-Berestein G., Hopfer R., Mehta K. & Mills K. (1985). Selective toxicity and enhanced therapeutic index of liposomal polyene antibiotics in systemic fungal infections. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **446** : 390-402.

Jullien S., Brajtburg J. & Bolard J. (1990). Affinity of amphotericin B for phosphatidylcholine vesicles as a determinant of in vitro cellular toxicity of liposomal preparations. *Biochim. Biophys. Acta*, **1021** : 39-45.

Jullien S., Contrepolis A., Sligh J.E., Domart Y., Yeni P., Brajtburg J. Medoff G. & Bolard J. (1989). Study of the effects of liposomal amphotericin B on *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, and erythrocytes by using small unilamellar vesicles prepared from saturated phospholipids. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **33** : 345-349.

Kajtar M., Vikman M., Morlin E. & Szejtli J. (1989). Aggregation of amphotericin B in the presence of γ -cyclodextrine. *Biopolymers*, **28** : 1585-1596.

Kasha M. (1963). Energy transfer mechanisms and the molecular exciton model for molecular aggregates. *Rad. Res.* **20** : 55-71.

Kasha M. (1964). Classification of excitons. Dans : *Physical Processes in Radiation Biology*. (Eds. : Augenstein L. Mason R. & Rosenberg B.), Academic Press, New York, pp.17-22.

Kasha M., Rawls H.R. & El-Bayaumi M.A. (1965). The exciton model in molecular spectroscopy. *Pure Appl. Chem.* **11** : 371-392.

Kawaguchi T., Hamanaka T., Kito Y. & Machida H. (1991). Structural studies of a homologous series of alkyl sucrose ester micelle by X-ray scattering. *J. Phys. Chem.* **95** : 3837-3846.

Kerridge D. (1979). The polyene macrolide antibiotics. *Postgraduate Medical J.* **55** : 653-656.

Kerridge D. & Whelan W.I. (1984). The polyene macrolide antibiotics and 5-fluorocytosine : molecular actions and interactions. In the Symposium of the British Mycological Society. *Mode of Action of Antifungal Agents* (Eds. : Trinci A.P.J. & Ryley J.F.) pp.343-375.

Khutorsky V.E. (1992a). Structure of amphotericin B-cholesterol complex. *Biochim. Biophys. Acta*, **1108** : 123-127.

Khutorsky V.E. (1992b). Structure-activity relationships of ion transport compounds. *International J. Quantum Chem. : Quantum Biologie Symposium*, **19** : 187-196.

Kinsky S.C. (1963). Comparative responses of mammalian erythrocytes and microbial protoplasts to polyene antibiotics and vitamin A. *Arch. Biochem. Biophys.* **102** : 180-188.

Kinsky S.C., Demel R.A. & Van Deenen L.L.M. (1967). Hemolytic action of filipin and derivatives. *Biochim. Biophys. Acta*, **135** : 835-843.

Kirsh R., Goldstein R., Tarloff J., Parris D., Hook J., Hanna N., Bugelski P. & Poste G. (1988). An emulsion formulation of amphotericin B improves the therapeutic index when treating systemic murine candidiasis. *J. Infect. Dis.* **158** : 1065-1070.

Koldin M.H., Kobayashi G.S., Brajtburg J. & medoff G. (1985). Effects of elevation of serum cholesterol and administration of amphotericin B complexed to lipoproteins on amphotericin B-induced toxicity in rabbits. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **28** : 144-145.

Kotler-Brajtburg J., Price H.D., Medoff G. & Schlessinger D. (1974). Molecular basis for the selective toxicity of amphotericin B for yeast and filipin for animal cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **5** : 377-382.

Lampen J.O., Arnow P.M. & Safferman R.S. (1960). Mechanism of protection by sterols against polyene antibiotics. *J. Bacteriol.* **80** : 200-206.

Lamy-Freund M.T., Ferreira V.F.N. Faljoni-Alario A. & Schreier S. (1993). Effect of aggregation on the kinetics of autoxidation of the polyene antibiotic amphotericin B. *J. Pharm. Sci.* **82** : 162-166.

Lamy-Freund M.T., Ferreira V.F.N. & Schreier S. (1989). Polydispersity of aggregates formed by the polyene antibiotic amphotericin B and deoxycholate. A spin label study. *Biochim. Biophys. Acta*, **981** : 207-212.

Lamy-Freund M.T., Schreier S., Peitzsch R.M. & Reed W.F. (1991). Characterization and time dependence of amphotericin B : deoxycholate aggregation by quasielastic light scattering. *J. Pharmac. Sci.* **80** : 262-266.

Lematre J., Vaillier J. & Maugras M. (1977). L'étude de l'amphotéricine B dans les solvants hydrophobes : fluorescence de l'acide anilino-1 naphtalène-8 sulfonique (ANS) et variations chiroptiques; relation avec le complexe antifongique-cholestérol. *C.R. Acad. Sc. Paris*, **284** : 505-508.

Lichtenberg D., Robson R.J. & Denis E.A. (1983). Solubilization of phospholipids by detergents, structural and kinetic aspects. *Biochim. Biophys. Acta*, **737** : 285-304.

Lopez-Berestein G., Mehta R., Hopfer R.L, Mills K., Kasi L., Mehta K., Fainstein V., Luna M., Hersh E.M. & Juliano R. (1983). Treatment and prophylaxis of disseminated infection due to *Candida albicans* in mice with liposome-encapsulated amphotericin B. *J. Inf. Dis.* **147** : 939-945.

Lopez-Berestein G., Fainstein V., Hopfer R., Mehta K., Sullivan M.P., Keating M., Rosenblum M.G., Mehta R., Luna M., Hersh E.M., Reuben J., Juliano R.L. & Bodey G.P. (1985). Liposomal amphotericin B for the treatment of systemic fungal infections in patients with cancer : a preliminary study. *J. Infect. Dis.* **151** : 704-710.

Lopez-Berestein G., Bodey G.P., Fainstein V., Keating M., Frankel L.S., Zeluff B., Gentry L. & Mehta K. (1989). Treatment of systemic fungal infections with liposomal amphotericin B. *Arch. Intern. Med.* **149** : 2533-2536.

Lopez-Berestein G., Bodey G.P., Frankel L.S. & Mehta K. (1987). Treatment of hepatosplenic candidiasis with liposomal amphotericin B. *J. Clin. Oncol.* **5** : 310-317.

Lubkowski A., Blazejowski J., Czerwinski A. & Borowski E. (1989). Thermal behaviour and stability of amphotericin B. *Thermochim. Acta*, **155** : 29-38.

Mackaness G.B. (1990). Arguments for a new formulation of liposomal amphotericin B : An historical perspective. *J. Liposome Res.* **1** : 521-528.

Makino S. & Moriyama R. (1991). Interaction of proteins with sucrose esters. *Microemulsions and Emulsions in Foods*, 1991 : 182-192.

Makino S., Ogimoto S. & Koga S. (1983). Sucrose monoesters of fatty acids : Their properties and interaction with proteins. *Agric. Biol. Chem.* **47** : 319-326.

Marichal P., Vanden Bossche H., Moereels H. & Brasseur R. (1990). Mode of insertion of azole antifungals and sterols in membranes. Dans : *Molecular Description of Biological Membranes Components by Computer Aided Conformational Analysis*, (Ed. Brasseur R.), CRC Press, Boca Raton, Florida, Vol.2, pp. 27-42.

Mazer N.A. (1990). Quasielastic light scattering studies of aqueous biliary lipid systems and native bile. *Hepatology (Baltimore)*, **12** : 39S-44S.

Mazer N.A., Benedek G.B. & Carey M.C. (1980). Quasielastic light scattering studies of aqueous biliary lipid system. Mixed micelle formation in bile salt-lecithin solutions. *Biochemistry*, **19** : 601-615.

Mazierski J., Bolard J. & Borowski E. (1982). Self-association of some polyene macrolide antibiotics in aqueous media. *Biochim. Biophys. Acta*, **719** : 11-17.

Mazierski J., Grzybowska J. & Borowski E. (1990). Influence of net charge on the aggregation and solubility behaviour of amphotericin B and its derivatives in aqueous media. *Eur. Biophys. J.* **18** : 159-164.

Mc Rae E.G. (1961). Molecular vibrations in the exciton theory for molecular aggregates. *Austral. J. Chem.* **14** : 329-353.

Mc Rae E.G. & Kasha M. (1964). The molecular exciton model. Dans : *Physical Processes in Radiation Biology*. (Eds. : Augenstein L., Mason R. & Rosenberg B.), Academic Press, New York, pp.23-42.

Mechlinski W., Schaffner C.P., Ganis P. & Avitabile G. (1970). Structure and absolute configuration of the polyene macrolide antibiotic amphotericin B. *Tetrahedron Lett.* 3873

Medoff G., Brajtburg J., Kobayashi G.S. & Bolard J. (1983). Antifungal agents useful in therapy of systemic fungal infections. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **23** : 303-330.

Mehta R., Hsu M.J., Juliano R.L., Krause H.J. & Regen S.L. (1986). Polymerized phospholipid vesicles containing amphotericin B : Evaluation of toxic and antifungal activities in vitro. *J. Pharm. Sci.* **75** : 579-581.

Mehta R., Lopez-Berestein G., Hopfer R., Mills K. & Juliano R.L. (1984). Liposomal amphotericin B is toxic to fungal cells but not to mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 770 : 230-234.

Merck & Co., Inc. (1983) *The Merck Index*, 10th Ed. Merck & Co., Inc., Rathway, New Jersey, p.85.

Mickus D.E, Levitt D.G & Rychnovsky S.D. (1992). Enantiomeric cholesterol as a probe of ion-channel structure. *J. Am. Chem. Soc.* **114** : 359-360.

Milon A., Wolff G., Ourisson G. & Nakatani Y. (1986). 2. Organization of carotenoid-phospholipid bilayer systems. Incorporation of zeaxanthin, astaxanthin, and their C₅₀ homologues into dimyristoylphosphatidylcholine vesicles. *Helv. Chim. Acta*, **69** : 12-24.

Nadeau P., Gruda I., Medoff G. & Brajtburg J. (1982). Relative avidity of etruscomycin to cholesterol and ergosterol. *Antimicrob. Agents Chemother.* **21** : 545-550.

Nakamura T., Nishikawa M., Inoue K., Nojima S., Akiyama T. & Sankawa V. (1980). Phosphatidylcholine liposomes containing cholesterol analogs with side chains of various lengths. *Chem. Phys. Lipids*, **26** : 101-110.

Nashima K., Kawase N. & Kito Y. (1980). Effect of phospholipid and detergent on the Schiff base of cephalopod rhodopsin and metarhodopsin. *Biochim. Biophys. Acta*, **626** : 390-396.

New R.R., Chance M.L. & Heath S. (1981). Antileishmanial activity of amphotericin and other antifungal agents entrapped in liposomes. *J. Antimicrob. Chemother.*, **8** : 371-381.

Norman A.W., Demel R.A., De Kruijff B., Geurts van Kessel W.S.H. & Van Deenen L.L.M. (1972), Studies of the biological properties of polyene antibiotics : comparison of other polyene with filipin in their ability to interact specifically with sterol. *Biochim. Biophys. Acta*, **290** : 1-14.

Odds F.C. (1982). Interaction among amphotericin B, 5-fluorocytosine, ketoconazole, and miconazole against pathogenic fungi in vitro. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **22**: 763-770.

Ohki K., Nozawa Y. & Ohnishi S.I. (1979). Interaction of polyene antibiotics with sterols in phosphatidylcholine bilayer membranes as studied by spin probes. *Biochim. Biophys. Acta*, **554** : 39-50.

Osipov L., Snell F.D., York W.C. & Finchler A. (1956). Fatty acid esters of sucrose. *Ind. Eng. Chem.* **48** : 1459-1462.

Ostro M.J. & Cullis P.R. (1989). Use of liposomes as injectable drug delivery systems. *Am. J. of Hospital Pharmacy*, **46** : 1576-1587.

Patterson T.F., Miniter P., Dijkstra J., Szokan F.C., Ryan J.L. & Andriole V.T. (1989). Treatment of experimental invasive aspergillosis with novel amphotericin B / cholesterol sulfate complexes. *J. Infect. Dis.* **159** : 717-724.

Perun T.J. & Egan R.S. (1969). The conformation of erythromycin aglycones. *Tetrahedron Lett.* 687-390.

Proffitt R.T., Satorius A., Chiang S M., Sullivan L. & Adler-Moore J.P. (1991). Pharmacology and toxicology of a liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) in rodents. *J. Antimicrob. Chemother.* **28** : 49-61.

Ralph E.D., Khazindar A.M., Barber K.R. & Grant C.W.M. (1991). Comparative in vitro effects of liposomal amphotericin B, amphotericin B-deoxycholate, and free amphotericin B against fungal strains determined by using MIC and minimal lethal concentration susceptibility studies and time-kill curves. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **35** : 188-191.

Readio J.D. & Bittman R. (1982). Equilibrium binding of amphotericin B and its methyl ester and borate complex to sterols. *Biochim. Biophys. Acta*, **685** : 219-224.

Rebell G. (1966). Dans: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (Ed. : Hobby G.L.) Ann Arbor, Michigan, pp. 411-418.

Reuhl K.R., Vapiwala M., Ryzlak M.T. & Schaffner C.P. (1993). Comparative neurotoxicities of amphotericin B and its mono-methyl ester derivative in rats. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **37** : 419-428.

Rinnert H., Thirion C., Dupont G. & Lematre J. (1977). Structural studies on aqueous and hydroalcoholic solutions of a polyene antibiotic : Amphotericin B. *Biopolymers*, **16** : 2419-2427.

Rohatgi-Mukherjee K.K. (1978). *Fundamentals of Photochemistry*, Wiley, New York.

Saint-Pierre Chazalet M., Thomas C., Dupeyrat M. & Gary-Bobo C.M. (1988). Amphotericin B-sterol complex formation and competition with egg phosphatidylcholine : a monolayer study. *Biochim. Biophys. Acta*, **944** : 477-486.

Salares V.R., Young N.M., Carey P.R. & Bernstein H.J. (1977). Excited state (exciton) interactions in polyene aggregates. Resonance Raman and absorption spectroscopy evidence. *J. Raman Spectr.* **6** : 282-288.

Sandermann H. (1978). Regulation of membrane enzymes by lipids. *Biochim. Biophys. Acta*, **515** : 209-237.

Sarosi G.A.,(1990) Amphotericin B still the "gold standard" for antifungal therapy. *Postgrad. Med.(USA)* **80** : 151-2, 155-61, 165-6

Sawaya B.P., Weihprecht H., Campbell W R., Lorenz J.N., Webb R.C. Briggs J.P. & Schnerman J. (1991). Direct vasoconstriction as a possible cause for amphotericin B-induced nephrotoxicity in rats. *J. Clin Invest.* **87** : 2097-2107.

Schaefer A., Komlos M. & Sergei A. (1975). Lipid peroxidation as the cause of the ascorbic acid induced decrease of adenosine triphosphatase activities of rat brain microsomes and its inhibition by biogenic amines and psychotropic drugs. *Biochem. Pharmacology*, **24** : 1781-1786.

Scherphof G., Roerdinch F. & Waite M. (1978). Desintegration of phosphatidylcholine liposomes in plasma as a result of interaction with high density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **542** : 296-302.

Schick M. (ed.). (1966). *Nonionic surfactants*, Marcel Dekker, Inc., New York. p.933.

Schreier S., Ferreira V.F.N. & Lamy-Freund M.T. (1985). ESR studies of molecular aspects of the mechanism of drug action : autoxidation of the polyene antibiotic amphotericine B. Dans : *Magnetic Resonance in Biologie and Medicine*. (Eds : Girjesh Govil, Cl Khetrapal, Avil Sarar), McGraw-Hill Publishing Company Ltd, New Delhi, pp. 319-331.

Seok Jou W. & Chun P.W. (1991). Molecular mechanics of the formation of cholic acid micelles. *J. Mol. Graphics*, **9** : 237-246.

Shang Q.Y., Dou X. & Hudson B.S. (1991). Off-axis orientation of the electronic transition moment for a linear conjugated polyene. *Nature*. **352** : 703-705.

Shervani Z., Sarkar A.K. & Bachhawat B.K. (1991). Polyene antibiotics in the membrane environment. *Indian J. Biochem. & Biophys.* **28** : 227-232.

Shimomura M., Ando R. & Kunitake T. (1983). Orientation and spectral characteristics of the azobenzene chromophore in the ammonium bilayer assembly. *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.* **87** : 1134-1143.

Simpson W.T. & Peterson D.M. (1957). Coupling strength for resonance force transfer of electronic energy in van der Waals solids. *J. Chem. Phys.* **2** : 588-593

Son K. & Alkan H. (1989). Liposomes prepared dynamically by interactions between bile salt and phospholipid molecules. *Biochim. Biophys. Acta*, **981** : 288-294.

Sowinski P., Pawlak J. & Borowski E. (1992). ¹H NMR model studies of amphotericin B: comparison of x-ray and NMR stereochemical data. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **30** : 275-279

Steiner C.A. (1991). Polymer-surfactant interactions in graft copolymer solutions. *J. Appl. Polym. Sci.* **42** : 1493-1499.

Strauss G. (1981). The interaction of amphotericin B with lipid bilayer vesicles : determination of binding constants by absorption and fluorescence spectroscopy. *Can. J. of Spectroscopy*, **26** : 95-102.

Szoka F.C., Milholland D. & Barza M. (1987). Effect of lipid composition and liposome size on toxicity and in vitro fungicidal activity of liposome-intercalated amphotericin B. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **31** : 421-429.

Szponarski W. & Bolard J. (1987). Temperature-dependent modes for binding of the polyene antibiotic amphotericin B to human erythrocyte membranes. A circular dichroism study. *Biochim. Biophys. Acta*, **897** : 229-237.

Szponarski W., Wietzerbin J., Borowski E. & Gary-Bobo C.M. (1988). Interaction of ¹⁴C-labeled amphotericin B derivatives with human erythrocytes : relationship between binding and induced K⁺ leak. *Biochim. Biophys. Acta*, **938** : 97-108.

Tasset C., Goethals F., Pr  at V. & Roland M. (1990). Effect of polyoxyethyleneglycol (24) cholesterol on the solubility, toxicity and activity of amphotericin B. *Inter. J. Pharmac.* **58** : 41-48.

Tasset C., Pr  at V. & Roland M. (1991). The influence of Myrj 59 on the solubility, toxicity and activity of amphotericin B. *J. Pharm. Pharmacol.* **43** : 297-302.

Taylor A.W., Costello B.J., Hunter P.A., MacLachlan W.S. & Shanks C.T. (1993). Synthesis and antifungal selectivity of new derivatives of amphotericin B modified at the C-13 position. *J.Antibiot.* **46** : 486-493.

Taylor R.L., Williams D.M., Craven P.C., Graybill J.R., Drutz D.J. & Magee W.E. (1982). Amphotericin B in liposomes : a novel therapy for histoplasmosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **125** : 610-611.

Teerlink T., De Kruijff B. & Demel R. (1980). The action of pimarinic, estruscomycin and amphotericin B on liposomes with varying sterol content. *Biochim. Biophys. Acta*, **599** : 484-492.

Thibault E. (1990). *Synthèse de la N-dodécyl- β -alanine et interactions avec l'amphotéricine B*, projet de fin d'étude, Université du Québec à Trois-Rivières.

Thomas A.H. (1986). Suggested mechanisms for the antimycotic activity of the polyene antibiotics and the N-substituted imidazoles. *J. Antimicrob. Chemother.* **17** : 269-279.

Tomioka H. & Itoh T. (1991). Photochromism of spiropyrans in organized molecular assemblies. Formation of J- and H-aggregates of photomerocyanines in bilayers-clay matrices. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1991** : 532-533.

Urbina J.A., Cohen B.E., Perozo E. & Cornivelli L. (1987). Spin-labeled amphotericin B : synthesis, characterization, biological and spectroscopic properties. *Biochim. Biophys. Acta*, **897** : 467-473.

Vanden Bosche H. (1985). Biochemical targets for antifungal azole derivatives : hypothesis on the mode of action . Dans : *Current Topics in Medical Mycology 1*. (Ed. : McGinnis M.R.), Springer-Verlag, New York, pp.313-351.

Van Etten E.W.M., Van de Rhee N.E., Van Kampen M. & Bakker-Woudenberg I.A.J.M. (1991). Effects of amphotericin B and fluconazole on the extracellular and

intracellular growth of *Candida albicans*. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **35** : 2275-2281.

Van Hoogevest P. & De Kruijff B. (1978). Effect of amphotericin B on cholesterol-containing liposomes of EPC and didocosenoyle PC. A refinement of the model for the formation of pores by amphotericin B in membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **511** : 397-407.

Vertut-Croquin A., Bolard J., Chabbert M. & Gary-Bobo C. (1983). Differences in the interaction of the polyene antibiotic amphotericin B with cholesterol- or ergosterol-containing phospholipid vesicles. A circular dichroism and permeability study. *Biochemistry*, **22** : 2939-2944.

Vertut-Doi A., Hannaert P. & Bolard J. (1988). The polyene antibiotic amphotericin B inhibits the sodium / potassium pump of human erythrocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157** : 692-697.

Van't Wout J.W., Mattie H. & Van Fourth R. (1989). Comparison of the efficacies of amphotericin B, fluconazole and itraconazole against a systemic *Candida albicans* infection in normal and neutropenic mice. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **33** : 147-151.

Wasan K.M., Brazeau G.A., Keyhani A., Hayman A.C. & Lopez-Berestein G. (1993). Roles of liposome composition and temperature in distribution of amphotericin B in serum lipoproteins. *Antimicrob. Agents and Chemother.* **37** : 246-250.

Yoshida Y. & Aoyama Y. (1986). Interaction of azole fungicides with yeast cytochrome P-450 which catalyzes lanosterol 14 α -demethylation. Dans : *In Vitro and In Vivo Evaluation of Antifungal Agents*. (Eds. : Iwata K. & Vanden Bosche H.), Elsevier, Amsterdam, p.123.

ANNEXE A

Matériel chimique

- **Amphotéricine B** provient de Sigma (St.Louis, Miss., USA), pure de 80%; conservée à 5 °C.
- **Fungizone** : de Squibb Canada Inc.(Montréal, Canada); conservée à 5 °C.
- **Diméthyle sulphoxide (DMSO)**: de Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA).
- **Monolaurate de sucrose (LS)**; de Mitsubishi-Kasei Food Corporation (Tokyo, Japon)
- **Tween 80**: de Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA).
- **Cholestérol**: de Sigma (St.Louis, Miss., USA); deux fois cristallisé dans l'éthanol.
- **Ergostérol**: de Sigma (St.Louis, Miss., USA); deux fois cristallisé dans l'éthanol.
- **Hecameg** {6-O-(N-heptylcarbamoyl)-méthyle- α -D-glucopyranoside}: de Vegatec (Villejuif, France).

- **F6C2MALT-1** {2'-(F-hexyl)-ethyl-4-O-(α -D-glucopyranosyl) $\alpha\beta$ -D-glucopyranoside} du Laboratoire de chimie moléculaire, Université de Nice, France.
- **γ -Cyclodextrine**: de Sigma (St.Louis, Miss., USA).
- **Phosphate de sodium monobasique** (NaH_2PO_4) et **phosphate de sodium dibasique** (Na_2HPO_4) : de J.T.Baker Chemical Co. (Phillipsburg, NJ, USA) ; utilisés pour la préparation de la solution tampon de pH=7,4 à la concentration 0,1 M.
- **Lécithine d'oeuf et l'acide glycocholique**: de Sigma (St.Louis, Miss., USA); ont servi pour la préparation des micelles mixtes d'après la description de Son et Alkan (Son *et al.* 1989).
- **Dextrose** (D-glucose) : de Sigma (St.Louis, Miss., USA).
- **n-Propanol** : de Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wisc, USA)
- **Sérum total humain** : de Sigma (St.Louis, Miss., USA); conservé à -15°C .
- **Sérum humain sans lipoprotéines** : de Sigma (St.Louis, Mo., USA); contient <1% w/w des lipoprotéines et 4,1 % w/w des protéines.
- **Lipoprotéines : VLDL, LDL, HDL**, ont été préparées dans le laboratoire d'hématologie par le groupe du professeur Raynald Gareau (Département chimie-

biologie, Université du Québec à Trois-Rivières). Les lipoprotéines ont été séparées du sérum humain par ultracentrifugation séquentielle à 18 °C d'après la méthode décrite par Hatch et Lecs (Hatch *et al.* 1968). Elles ont été ensuite récupérées selon la région de la densité :

- VLDL, lipoprotéines à très basse densité de <1,006 g/ml;
- LDL, lipoprotéines à basse densité de 1,006 à 1,063 g/ml;
- HDL, les lipoprotéines à grande densité de 1,063 à 1,200 g/ml;

- **Sephadex G-25M** : de Pharmacia LKB Biotechnology (Uppsala, Suède).
- **Souris BALB/c** : de Charles River Canada, Inc. (Saint-Constant, Québec) et de l'animalerie de l'Université du Québec à Trois-Rivières.
- **Eau pure** : distillée et déminéralisée dans le Département chimie-biologie, Université du Québec à Trois-Rivières.

ANNEXE B

Méthodes physicochimiques

(1) Spectroscopie d'absorption UV-VIS

Dans la région ultraviolet et visible, le phénomène d'absorption résulte du changement d'état électronique d'un atome ou d'une molécule, c'est-à-dire l'absorption de la lumière permet de porter la molécule à des états électroniquement excités. La valeur d'absorption dépend de la concentration des molécules absorbantes présentes en solution et du trajet optique. Selon la loi de Beer-Lambert :

$$A_{(\lambda)} = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon_{(\lambda)} \cdot c \cdot l$$

où:

$A_{(\lambda)}$ = valeur d'absorption, l'absorbance à la longueur d'onde λ ;

I_0, I = intensité de la lumière incidente et transmise respectivement;

$\varepsilon_{(\lambda)}$ = coefficient molaire d'extinction à la longueur d'onde λ , de la molécule étudiée dans un environnement donné, [$M^{-1} cm^{-1}$];

c = concentration des molécules absorbantes, [mole/l];

l = trajet optique, [cm].

Si les caractéristiques de la molécule ne sont pas modifiées lorsque la concentration varie, la valeur d'absorbance est proportionnelle à la concentration. Un écart de cette linéarité indique des effets de concentration tels que l'autoagrégation des molécules. La variation d'absorbance en fonction de la longueur d'onde donne naissance à un spectre d'absorption UV-VIS.

La nature de la transition observée dans le cas des polyènes correspond à une transition $\pi \rightarrow \pi^*$. Les bandes d'absorption proviennent des transitions se produisant au niveau fondamental vers les différents niveaux vibrationnels de l'état excité.

Appareillage et conditions de lecture des spectres

Spectrophotomètre Milton Roy Spectronic 3000 Array

Paramètres:

range of wavelength	300.0-450.0 nm
spectral slitwidth	2 nm
detector slitwidth	0.37nm
exposure time	540 ms

Température ambiante.

Chaque expérience a été effectuée au moins trois fois.

Préparation des solutions

Les substances ont été pesées précisément à $\pm 0,00002$ g, sur une balance Mettler H54AR.

Les mélanges de l'AmB avec LS

Pour toutes les expériences dont les résultats sont présentés dans le Chapitre 4.1, les solutions d'AmB ont été préparées à partir de la solution-mère de l'antibiotique

toujours $5,0 \times 10^{-5}$ M de la façon suivante : 5 μ moles d'AmB dissous dans 1,0 ml de DMSO, dilués à 100 ml avec de l'eau. La solution-mère d'AmB était utilisée seulement pendant une journée.

Les solutions-mères de LS ($5,0 \times 10^{-2}$ ou $2,0 \times 10^{-2}$ M) ont été obtenues par dissolution de la substance dans l'eau. Elles étaient utilisées pendant un mois et conservées à 5 °C.

En utilisant différentes quantités de ces solutions-mères avec l'ordre d'ajout: solution-mère d'AmB, solution-mère de LS, eau, nous avons obtenu les mélanges à étudier.

La lecture des spectres a été effectuée 10 minutes après la préparation des solutions finales. La référence était l'eau.

Les solutions de Fungizone

Toutes les solutions de Fungizone ont été préparées par dissolution de la masse pesée de Fungizone dans l'eau.

Les mélanges de l'AmB avec le DOC

Pour les études des solutions AmB-DOC, nous avons utilisé le milieu tampon (solution aqueuse des phosphates de sodium) à pH = 7,4, c'est-à-dire que la solution-mère d'AmB a été préparée de la même façon que dans le cas des mélanges avec LS, mais dans le milieu tampon, et les solutions-mère de DOC ($5,0 \times 10^{-3}$ ou $1,0 \times 10^{-2}$ M) ont été faites par dissolution de cette substance dans le tampon. Les solutions-mères de DOC étaient utilisées pendant une semaine et conservées à 5 °C.

En utilisant différentes quantités de ces solutions-mères avec l'ordre d'ajout suivant : solution-mère d'AmB, solution-mère de DOC et tampon, nous avons obtenu les mélanges à étudier.

La lecture des spectres a été réalisée quelques minutes après la préparation des solutions finales. La solution tampon a servi de référence.

Les mélanges de l'AmB avec le Tween 80

Ces solutions ont été préparées et examinées de façon identique aux mélanges AmB-LS.

Les mélanges de l'AmB avec le DOC en présence des stérols

Les mélanges étudiés contenant de l'AmB, du DOC et du cholestérol ou de l'ergostérol, ont été faits à partir de la solution-mère d'AmB, à laquelle nous avons ajouté : la quantité exacte de la solution-mère de DOC (voir la préparation des mélanges AmB-DOC), la quantité calculée de la solution-mère de stérol, la quantité de *n*-propanol pour obtenir une solution finale de 6,5 % de *n*-propanol et la solution tampon jusqu'au niveau de calibration du ballon jaugé utilisé. Le rapport molaire AmB : stérol dans les solutions finales a toujours été 1.

Les solutions-mère de stérols ($1,0 \times 10^{-4}$ M) ont été préparées dans le *n*-propanol, conservées à 5 °C et utilisées pendant une semaine.

Les spectres ont été enregistrés 45 minutes après la préparation des solutions finales. La référence : *n*-propanol 6,5% en volume.

Les mélanges de l'AmB avec la γ -cyclodextrine en présence des stérols

Ces solutions ont été préparées et examinées de façon identique aux mélanges AmB-DOC-stérol, mais en utilisant l'eau pure au lieu du tampon.

La solution-mère de γ -cyclodextrine était $2,52 \times 10^{-2}$ M.

Les mélanges de l'AmB seule ou avec du LS dans le sérum humain total

Pour cette série expérimentale, la solution-mère d'AmB était préparée à une concentration de $1,0 \times 10^{-3}$ M (ou de $2,6 \times 10^{-4}$ M pour les résultats présentés dans le Tableau 6), et la solution-mère de LS à la concentration de $1,0 \times 10^{-1}$ M.

Les solutions finales étaient obtenues selon l'ordre d'ajout: solution-mère d'AmB, solution-mère de LS, sérum total. Leur concentration en sérum a toujours été 90% en volume.

Les spectres ont été enregistrés de 30 à 45 minutes après la préparation des solutions. La référence : la solution sérum-eau de rapport volumique 9 : 1.

Les mélanges de l'AmB seule ou avec du LS dans le sérum humain sans lipoprotéines

Ces solutions ont été préparées et examinées de la même façon que les mélanges AmB-LS-sérum total.

Les mélanges de la Fungizone avec le sérum totale ou le sérum sans lipoprotéines

À 1 ml de la solution-mère de Fungizone ($2,6 \times 10^{-4}$ M d'AmB) dans l'eau, on a ajouté un volume de 9 ml de sérum total ou de sérum sans lipoprotéines. Les spectres ont été enregistrés de 30 à 45 minutes après la préparation des solutions.

Les mélanges de la Fungizone avec les lipoprotéines

La préparation des lipoprotéines de densités différentes est décrite dans l'Annexe A. À 1 ml de la solution-mère de Fungizone dans l'eau ($2,6 \times 10^{-4}$ M d'AmB), on a ajouté le volume approprié de lipoprotéines contenant 5,4 mmoles du cholestérol et

ensuite la solution tampon phosphate jusqu'au volume total de 10 ml. Les spectres ont été enregistrés de 30 à 45 minutes après la préparation des solutions.

Les solutions des micelles mixtes lécithine d'oeuf-acide glycocholique dans le sérum humain total

La préparation de ces micelles mixtes est décrite par Son et Alkan (voir Annexe A). La concentration finale d'AmB dans la solution des micelles mixtes est de $9,0 \times 10^{-6}$ M et la concentration finale de sérum est de 90 % en volume. Les spectres ont été enregistrés de 30 à 45 minutes après la préparation des solutions.

La préparation des solutions à administrer aux souris, qui ont aussi été examinées par la spectroscopie d'absorption UV-VIS, est décrite dans l'Annexe C.

(2) Spectroscopie d'absorption de dichroïsme circulaire (DC)

Le dichroïsme circulaire est la mesure de la différence d'absorption entre la lumière polarisée circulaire gauche et la lumière polarisée circulaire droite. Cette différence dépend de la molécule étudiée, de son orientation par rapport aux molécules et structures voisines, des charges situées dans son environnement.

Donc, le dichroïsme circulaire est la mesure de :

$$\Delta A_{(\lambda)} = \Delta \epsilon_{(\lambda)} \cdot c \cdot l$$

avec $\Delta \epsilon = \epsilon_g - \epsilon_d$

d'ou : $\Delta A_{(\lambda)} = A_{(\lambda)g} - A_{(\lambda)d}$

La variation de $\Delta \epsilon$ en fonction de la longueur d'onde donne naissance à un spectre de dichroïsme circulaire.

L'appareillage

Jobin-Yvon Mark V dichrograph.

Préparation des solutions

La préparation des solutions est décrite dans la partie de spectroscopie d'absorption UV-VIS. La cuvette avec la solution déjà examinée par l'absorption UV-VIS, était transférée dans l'appareil de dichroïsme circulaire pour réaliser le spectre de DC.

Les courbes de variation de la valeur du doublet dichroïque en fonction de la concentration du surfactant représentent la moyenne des résultats de trois expériences. Le plus grand écart de la moyenne est de $\pm 10 \%$.

(3) Diffusion de la lumière

En général, on peut exprimer l'intensité de la lumière diffusée par la formule de Rayleigh :

$$I = I_0 \left[\frac{n_1^2 - n^2}{n^2} \cdot \frac{Nv^2}{\lambda^4 r^2} (1 + \cos^2 \beta) \right]$$

où : I, I_0 = intensité de la lumière diffusée et incidente, respectivement;

n_1, n = indice de réfraction de la particule diffusante et du milieu respectivement;

N = nombre de particules diffusantes;

v = volume d'une particule;

λ = longueur d'onde de la lumière;

r = distance d'observation;

β = angle entre la lumière incidente et la lumière diffusée;

ou sous forme simplifiée :

$$I = I_0 \cdot k \frac{N v^2}{\lambda^4}$$

En résumé, l'intensité diffusée est inversement proportionnelle à la 4^e puissance de la longueur d'onde et proportionnelle à l'intensité incidente. Pour une substance donnée et pour une forme sphérique, la lumière diffusée est proportionnelle au carré du volume de la forme (particule) diffusante, c'est-à-dire à la 6^e puissance du rayon de la forme.

Le signal de diffusion de la lumière était mesuré à l'aide d'un spectrofluorimètre en utilisant un angle de 90° entre la lumière d'excitation et la lumière d'émission. Les deux longueurs d'onde pour l'excitation et l'émission ont été fixées à 450 nm, où aucune des substances utilisées n'absorbe la lumière. Les résultats obtenus sont présentés en unités arbitraires.

Appareillage et paramètres de mesure

Spectrofluorimètre Shimadzu RF-540

Paramètres de mesure

abscissa scale	x 32
scan speed	medium
excitation slit (nm)	10
excitation wavelength	450,0
excitation start wavelength	300,0
emission start wavelength	300,0

ordinate scale	x 128
sensitivity	low
emission slit (nm)	10
emission wavelength	450,0
excitation end wavelength	500,0
emission end wavelength	500,0

Les résultats présentés sont la moyenne des données obtenues de trois expériences. Le plus grand écart de la moyenne est de $\pm 9 \%$.

Préparation des solutions

Voir la préparation des solutions pour la méthode de spectroscopie d'absorption UV-VIS.

(4) Chromatographie d'exclusion par la taille

Le mécanisme de séparation par la chromatographie d'exclusion par la taille résulte du fait que les formes de petit volume hydrodynamique peuvent facilement s'insérer dans les pores du gel remplissant la colonne, par contre les formes à grande taille ne sont pas en mesure de se placer dans ces pores-cachettes et elles passent plus vite par la colonne (Gouw T.H, 1976).

Nous avons travaillé avec une colonne de 1 cm de diamètre remplie de 40 cm³ de Sephadex G-25M. Le facteur de dilution est près de 2.

La solution examinée a été le mélange d'AmB ($6,5 \times 10^{-6}$ M) et de LS ($5,0 \times 10^{-2}$ M), préparée de la façon décrite dans la Préparation des solutions pour la spectroscopie d'absorption UV-VIS. Les points importants dans la technique de cette expérimentation sont suivants:

- rinçage de la colonne avec 30 ml d'eau pure;
- introduction de 2,5 ml de la solution étudiée sur la colonne;
- introduction de 15 ml d'eau pure sur la colonne;
- élution par fraction de 1 ml;
- dilution de chaque fraction par l'ajout d'un ml d'eau.

Les solutions finales ont été examinées par la méthode de diffusion de la lumière et la spectroscopie d'absorption UV-VIS. Les résultats présentés sur la Figure 25 sont la moyenne de trois expériences.

(5) Ultracentrifugation

Appareillage et les paramètres d'étude

Ultracentrifugeuse Beckman L8-70M.

	1 ^{ère} expérience	2 ^{ème} expérience	3 ^{ème} expérience
Rotor	type 70,1	type 70,1	type 70,1
Vitesse	40 000 tr/min	50 000 tr/min	65 000 tr/min
Temps	2 h	3 h	12 h
Température	25°C	25°C	25°C

Préparation des solutions : comme pour la spectroscopie d'absorption UV-VIS.

Après ultracentrifugation, le surnageant a été examiné par spectroscopie d'absorption UV-VIS et par diffusion de la lumière. Chaque expérience a été répétée trois fois.

(6) Diffusion quasi élastique de la lumière

La vitesse de fluctuations d'intensité diffusée dépend de la vitesse de déplacement des particules. Les particules grosses donnent les fluctuations lentes, les petites des fluctuations rapides. La constante de diffusion de translation (D) peut être calculée d'après le déplacement Doppler :

$$\Delta v_{1/2} = \frac{k^2 D}{\pi}$$

où : k = constante optique; $k = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta/2)$ avec $\lambda = \frac{\lambda_0}{n}$

λ = longueur d'onde de la lumière dans le milieu;

n = indice de réfraction;

θ = angle d'observation (usuellement 90°);

ou d'après l'expression reliant la vitesse de déclin (G_τ) avec la vitesse de déplacement des molécules (G_0) :

$$\ln \frac{G_\tau}{G_0} = - 2 k^2 D t$$

où : k = constante optique;

t = temps de fluctuations.

La valeur connue de la constante de diffusion (D) permet de calculer le diamètre ou le rayon de la forme diffusante sphérique d'après la relation de Stokes-Einstein :

$$R_H = \frac{k T}{6 \pi \eta D}$$

où : R_H = rayon hydrodynamique de la particule;

k = constante de Boltzmann;

T = température;

η = viscosité du solvant.

Dans notre cas, les fluctuations de l'intensité de la lumière diffusée par des formes présentes dans la solution étudiée ont été enregistrées par un photomultiplicateur à 64 canaux et traitées par la fonction d'autocorrélation. Comme résultat, on obtient le diamètre moyen de ces formes.

Appareillage

Laser Scattering Spectrometer Model HN5-90 Nicomp Instruments (comportant un laser hélium-néon de 632,8 nm de longueur d'onde) et Computing Autocorrelator Model TC-100 Nicomp Instruments.

Préparation des solutions

Les solutions ont été préparées de façon identique aux solutions pour la spectroscopie d'absorption UV-VIS. Chaque solution a été examinée par l'autocorrélateur deux fois : la première fois, juste après la préparation, et la deuxième, après centrifugation de cette solution à l'aide d'une centrifugeuse Eppendorf 5415C à 10 000 tr/min pendant 2 minutes. Grâce à la centrifugation, nous avons pu s'assurer de la présence des formes à 305 ± 25 nm de diamètre à côté de celles de 580 ± 20 nm.

La viscosité des solutions étudiées était celle de l'eau pure à 20 °C.

Les expériences ont été répétées plusieurs fois. Les résultats présentés sont des valeurs moyennes de trois expériences \pm l'écart-type.

Exemple des résultats d'une mesure:

ANNEXE C

Méthode biologique

Les souris utilisées sont de BALB/c femelles âgées de 7 à 10 semaines dans les groupes de 6 à 12 animaux par expérience.

Pour obtenir des concentrations semblables d'AmB dans les solutions à injection pour une dose de l'antibiotique et sachant que:

- le volume de la solution à injection est constant et de 0,2 ml;
- la dose de l'AmB administrée est calculée par kilogramme de poids;
- l'état d'agrégation de l'AmB dépend de sa concentration;

nous avons travaillé avec des souris de 19 à 20,5 g.

Les souris ont subi une injection dans la veine de la queue qui a duré minimum deux minutes. Après trois semaines d'observation, les souris ont été sacrifiées à l'aide de chloroforme.

Préparation des solutions

Une balance Mettler H54AR avec précision de $\pm 0,00002\text{g}$ a été utilisée pour peser les substances.

Toutes les solutions à injection ont été préparées dans du dextrose de 5% de 30 à 60 min avant les piqûres. L'état d'agrégation de l'AmB dans chaque solution à injecter a été examiné par le spectre d'absorption UV-VIS.

Tout le matériel indispensable pour la manipulation ainsi que la solution aqueuse de dextrose 5 % ont été stérilisés.

Solutions de Fungizone

La masse pesée de la Fungizone, calculée d'après son contenu en AmB, a été dissoute dans une solution aqueuse de dextrose 5 %.

Solutions d'AmB avec un surfactant (excluant le DOC)

L'ordre d'ajout dans la préparation de ces solutions est le suivant :

masse pesée d'AmB + 0,3 ml de DMSO + le volume exact de la solution-mère de surfactant + solution aqueuse de 5 % de dextrose jusqu'à un volume de 10 ml.

Aux préparations contenant des concentrations élevées de LS, nous avons ajouté la solution d'héparine dans 5 % de dextrose, en quantité de 5 U /100 g du poids de souris.

Solutions d'AmB avec le DOC

Pour cette étude une solution de dextrose 5% a été préparée dans une solution tampon phosphate à pH 7,4. La technique de préparation de la solution à injection a été la même que pour les autres surfactants.

Les résultats présentés sur les figures 37, 39 et 40 sont la moyenne de 3 à 6 expériences. Ils ont été comparés en utilisant l'analyse statistique, le test Student *t*. Les résultats avec la valeur $P < 0,05$ ont été considérés comme significatifs.